ORSAY
n° d'ordre : 1576

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le grade de DOCTEUR ès-sciences

PAR

Mademoiselle LEDUC Mireille

SUJET : Un nouveau type de paroi bactérienne chez une souche de B. Subtilis

soutenue le 11 décembre 1975 devant la Commission d'examen

MM. SJULMASTER Président

LEGAULT-DEMARE

VANHEIJENOORT

ASSELINEAU

LANDMAN

ETUDE D'UN NOUVEAU TYPE DE PAROI BACTERIENNE CHEZ UNE SOUCHE DE *B. subtilis*.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Monsieur E. BRICAS, je ne pourrai oublier la gentillesse de votre accueil quand je suis entrée dans le laboratoire de Synthèse des Peptides pour réaliser ce travail et je vous en remercie profondément.

Monsieur J.SZULMAJSTER, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour votre bienveillance à mon égard et pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être Président du jury de cette thèse.

Monsieur J. van HEIJENOORT, vous m'avez guidée, aidée et soutenue dans la conduite de ce travail avec une totale disponibilité et une bonne humeur constante qui m'ont profondément touchée. Je suis heureuse de pouvoir, aujourd'hui, vous exprimer ma profonde reconnaissance.

Messieurs J. LEGAULT-DEMARE, J. ASSELINEAU, O. LANDMAN je vous adresse mes remerciements très respectueux pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail et pour avoir accepté d'être membres du jury de cette thèse.

Je veux aussi remercier :

Madame M. KAMINSKY pour sa fructueuse coopération dans les expériences d'immunochimie,

Monsieur J. LAPORTE, Madame E. KERYER, Mademoiselle ROUSSEAU et Monsieur B. FLOURET pour leur agréable et indispensable aide technique,

Madame A. MANTOT pour son amicale coopération dans les autoanalyses,

et enfin, tous ceux que je ne peux citer et qui m'ont manifesté leur amitié et leur dévouement en m'apportant de façon désintéressée leur concours lors de la réalisation de cette thèse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548117_0044

LISTE DES ABREVIATIONS

DAP : acide 2,6 diaminopimélique

DEAE : diéthylaminoéthyl

Gal : galactosamine

Glc : glucosamine

Mur : acide muramique

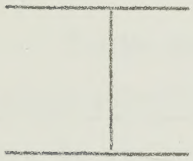
NAG : N-acétylglucosamine

NAM : acide N-acétylmuramique

SDS : dodécylsulfate de sodium

Tris : Tris (hydroxyméthyl)-aminoéthane

Glu : Le résidu de l'acide D-glutamique est impliqué dans la liaison peptidique par son γ-carboxyle.



représente l'acide meso-diaminopimélique.

DNP : dinitrophényl

INTRODUCTION

Un nouveau type de paroi bactérienne présentant une structure originale et comportant une partie protéique prépondérante est décrit dans ce travail. Il s'agit de la paroi de Bacillus subtilis cbl-1.

Cette souche a été isolée à partir de cultures de spores de Bacillus subtilis 168 wt. Elle est apparue sur milieu gélosé sous forme de petites colonies blanches (d'où la désignation cbl-1) distinguables des grosses colonies brun-foncé de B. subtilis 168 wt (124). Il n'a pas encore été établi en toute rigueur s'il existe ou non une filiation directe entre les deux souches 168 wt et cbl-1. Cependant, B. subtilis cbl-1 est infecté par le phage PBS-1 et le rapport des bases G + C de son acide désoxyribonucléique est de 43% (124). Ces faits sont bien caractéristiques d'une souche de Bacillus subtilis.

En raison de la grande originalité de la structure de la paroi de B. subtilis cbl-1, nous avons entrepris des études morphologiques et biochimiques bien que cette souche n'ait pas encore fait l'objet d'une analyse génétique poussée. Notre travail s'est développé en plusieurs étapes :

- Nous avons tout d'abord établi une corrélation entre les aspects morphologiques de la paroi mis en évidence par microscopie électronique et la nature des constituants pariétaux déterminée par analyse chimique.

- La nouveauté de la paroi de B. subtilis cbl-1 tient, d'une part, à la présence d'une partie protéique importante formée essentiellement d'une protéine de haut poids moléculaire appelée protéine cbl-1, et d'autre part, à l'absence totale d'acides téïchoïques pariétal et membranaire. Après avoir localisé la protéine cbl-1 dans la paroi, nous avons étudié son isolement, sa purification et son mode d'association avec les autres macromolécules pariétales. En outre, cette partie protéique est anionique et semble remplir la même fonction que les acides téïchoïques en servant de réserve de cations divalents pour la cellule.

Par ailleurs,nous avons développé l'étude des macromolécules non protéiniques de cette paroi. Nous avons mis en évidence un peptidoglycane mince auquel est lié covalentiellement un polysaccharide à base de galactosamine et de glucosamine. Enfin, nous avons caractérisé le système autolytique de cette bactérie.

Bien que B. subtilis cbl-1 soit une bactérie gram-positive, sa paroi et son système autolytique présentent une ambivalence puisque par certains aspects, ils ressemblent à ceux d'une bactérie gram-négative tandis que par d'autres, ils se rattachent indiscutablement à la famille des bactéries gram-positives. Pour faciliter la compréhension des résultats originaux obtenus dans ce travail et pour situer son intérêt, nous avons pensé qu'il convenait, d'une part de rappeler brièvement quelques considérations concernant l'enveloppe de la cellule bactérienne et l'organisation de macromolécules de la paroi et, d'autre part, de faire le point sur nos connaissances actuelles au sujet des protéines des parois bactériennes.

A - L'enveloppe de la cellule bactérienne.

L'enveloppe de la cellule bactérienne peut être définie comme étant l'ensemble des structures fort complexes qui entourent le cytoplasme (113), qui confère à la bactérie de nombreuses propriétés biologiques. Cette enveloppe comprend essentiellement deux entités morphologiquement et fonctionnellement distinctes : la membrane cytoplasmique, la paroi. La membrane cytoplasmique est la plus interne et délimite l'espace intracellulaire. Chez les bactéries, outre son rôle comme barrière de perméabilité qui contrôle la plupart des échanges avec le milieu extérieur, elle exerce des fonctions primordiales dans le métabolisme énergétique et, sans doute aussi, dans la réplication du chromosome (27, 85).

Etant située à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, la paroi constitue une structure exocellulaire. Chez la plupart des bactéries, l'examen au microscope électronique permet d'établir une distinction entre ces deux entités de l'enveloppe (27, 54). La différence de fonctions entre membrane cytoplasmique et paroi apparaît clairement lors de la formation de protoplastes ou de sphéroplastes obtenus par l'action du lysozyme ou de la pénicilline en milieu hypertonique. Chez ces cellules, totalement ou en partie dépourvues de paroi, la forme initiale de la bactérie a disparu, mais il y a conservation de la viabilité et de la plupart des fonctions physiologiques. Cependant, la très grande fragilité de ces cellules au choc osmotique souligne l'importance de la paroi pour la survie de la bactérie. Ainsi, la paroi se caractérise par une rigidité qui fixe la forme de la bactérie et qui permet à celle-ci de résister aux effets de la pression osmotique interne. La paroi représente environ 15 à 30% en poids sec de la cellule (112, 78).

B - Anatomie de la paroi bactérienne.

La paroi doit sa rigidité à la présence d'un hétéropolymère de structure, appelé peptidoglycane* que nous retrouvons chez presque toutes les bactéries, à l'exception des formes L, des mycoplasmes et des bactéries halophiles. Le peptidoglycane se caractérise par une structure covalente réticulaire s'étendant à toute la surface bactérienne. Cette macromolécule géante conserve la forme de la bactérie et, telle une cotte de maille, protège la membrane cytoplasmique et le contenu intracellulaire.

Du fait de sa relative stabilité, le peptidoglycane a été l'une des premières macromolécules pariétales à être isolée, purifiée et caractérisée chimiquement. Actuellement, sa structure globale a été étudiée chez de nombreuses bactéries (49, 115). Dans tous les cas, le peptidoglycane semble être formé de longues chaînes osidiques linéaires pontées par de courtes chaînes peptidiques. Les chaînes de glycanes sont faites de l'alternance en liaisons β 1⟶4 de résidus de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique. Les chaînes peptidiques sont liées par une liaison amide à la fonction carboxylique des résidus d'acide N-acétylmuramique et leur structure varie selon l'espèce bactérienne considérée (49, 115).

Le peptidoglycane, qui représente en masse environ 30 à 40% de la paroi des bactéries gram-positives et seulement 5 à 10% de celle des bactéries gram-négatives, constitue la structure de base de la paroi. A côté de cet hétéropolymère, la paroi comprend toujours au moins un, et le plus souvent plusieurs autres types de polymères qui diffèrent selon que nous avons affaire à des bactéries gram-positives ou gram-négatives. Il en résulte une profonde différence dans la structure morphologique et dans l'organisation des parois de ces deux catégories de bactéries.

---

* Cet hétéropolymère est aussi désigné par les termes suivants : glycopeptide ou glycosaminopeptide ou muréine ou mucopeptide.

L'examen au microscope électronique montre que les parois des bactéries gram-positives présentent généralement une structure relativement homogène en épaisseur et en densité (54). Parfois, des structures en couches ont été observées, notamment chez Bacillus polymyxa (56, 95) et Bacillus fastidiosus (84). Nous trouvons presque toujours covalentiellement associées au peptidoglycane des bactéries gram-positives une ou plusieurs macromolécules qui sont des polysaccharides ou des polymères de polyols phosphate appelés acides téïchoïques (102). Ces macromolécules sont des antigènes de surface et contiennent des sites récepteurs de phages. Une partie de ces polymères serait située sur la face externe de la paroi (6, 31). Leur nature varie considérablement d'une espèce bactérienne à l'autre. De plus, pour une même souche, des variations importantes dans la nature de ces macromolécules pariétales ont été observées pour différentes conditions de culture (103). Enfin, il est à noter que les parois des bactéries gram-positives ne renferment que de faibles quantités de lipides.

Avec les bactéries gram-négatives, nous avons affaire à une situation beaucoup plus complexe. Les études effectuées par microscopie électronique ont révélé que l'enveloppe cellulaire est formée dans ce cas, d'une superposition de couches multiples alternativement denses et transparentes (54, 47). La confrontation de ces données morphologiques avec celle des études biochimiques a permis d'établir que l'enveloppe de ces bactéries comprend essentiellement trois entités différentes : une membrane cytoplasmique, une membrane externe et un peptidoglycane de très faible épaisseur intercalé entre ces deux membranes. La membrane externe, formée de phospholipides, de lipopolysaccharides et de protéines (96) constitue une structure relativement épaisse (90 Å). Le peptidoglycane est étroitement associé à cette membrane externe et l'ensemble peut être considéré comme formant la paroi proprement dite. En outre, il existe entre les deux membranes de nombreux points d'adhérence passant à travers le peptidoglycane (47). Au niveau de ces jonctions, il semble qu'il y ait fusion des deux membranes. La présence de telles jonctions jouerait un rôle important dans plusieurs phénomènes (biosynthèse des constituants de la membrane externe, infection bactériophagique, points d'ancrage de l'ADN chromosomique ... etc).

C - Protéines des parois bactériennes.

Il a été depuis longtemps reconnu que des protéines sont associées en quantités plus ou moins importantes aux parois des bactéries (112, 102). Toutefois, elles n'ont commencé à faire l'objet de travaux plus nombreux que depuis un passé très récent, contrairement aux autres macromolécules pariétales, dont l'étude s'est considérablement développée au cours des vingt dernières années. Plusieurs raisons peuvent expliquer cet état de fait. D'abord, peu de protéines pariétales présentent une propriété biochimique ou biologique intéressante reconnue (antigénicité, toxicité, activité enzymatique, site récepteur de phages, élément de structure) permettant d'effectuer aisément leur purification. Lorsqu'elles sont en faible quantités et qu'elles sont liées de façon non covalente aux autres polymères pariétaux, elles peuvent apparaître comme des éléments morphologiquement et fonctionnellement secondaires, difficilement distinguables de contaminants cytoplasmiques ou membranaires. Dans les cas où elles constituent une partie importante de la paroi, les techniques adéquates de solubilisation et de caractérisation ont longtemps fait défaut. Enfin, comme dans le cas des autres polymères pariétaux, il semble y avoir une différence assez nette entre les protéines de la paroi des bactéries gram-négatives et celles de la paroi des bactéries gram-positives.

Dans les parois, il existe une catégorie de protéines qui ont un rôle biologique spécifique. Ce sont les enzymes autolytiques ou autolysines qui hydrolysent spécifiquement des liaisons du peptidoglycane. Le nombre de ces activités et leur nature sont variables d'une bactérie à l'autre. Ces enzymes jouent des rôles importants dans l'extension de la paroi au cours de la croissance bactérienne, dans la formation du septum et dans la séparation des cellules. L'autolyse des parois lavées montre que les autolysines ont une affinité particulière pour elles. Cela se comprend par leur rôle qui est d'agir au niveau du peptidoglycane. Seuls des traitements dénaturants (chaleur, enzymes protéolytiques ...) éliminent leurs effets. Ces enzymes

ont des sites de fixation spécifiques, répartis sur toute la surface de la cellule, comme le montre les travaux de FAN (38), mais ils ne sont pas nécessairement liés au peptidoglycane bien qu'agissant sur cette macromolécule. Dans le cas de B. subtilis, les autolysines seraient liées aux acides téichoïques (19).

a) Bactéries gram-positives.

Les parois brutes obtenues après cassage de bactéries gram-positives et centrifugation différentielle, contiennent des fragments de membranes, comme le dénote la présence d'activités enzymatiques typiquement membranaires. Ainsi, il a été observé récemment que le système membranaire responsable de la biosynthèse du peptidoglycane reste associé avec les parois brutes de Staphylococcus aureus (35) et Micrococcus lysodeikticus (85). Une grande partie de ces éléments contaminants peuvent être éliminés par des lavages répétés avec des tampons salins. Cependant, les parois ainsi traitées renferment le plus souvent encore des quantités non négligeables de protéines : 5 à 10% et parfois d'avantage (102, 112). Il est très probable que ces protéines fassent partie intégrante des parois de presque toutes les bactéries gram-positives. Mais très tôt, dans les études biochimiques des parois, il est devenu une pratique courante de les éliminer par des traitements avec des protéases (102) et avec des détergents. Certes, cette façon de procéder a permis de développer l'étude des principales macromolécules de la paroi en dehors de toute interférence avec les protéines pariétales, mais elle a aussi contribué à retarder l'étude de ces mêmes protéines. Il convient de distinguer, peut-être un peu arbitrairement, entre des protéines liées de façon covalente à une macromolécule pariétale de celles qui ne le sont pas. Dans la première catégorie, deux exemples ont été particulièrement étudiés : la protéine A de Staphylococcus aureus et la protéine M de Streptococcus pyogenes.

La protéine A de S. aureus est liée directement au peptidoglycane, mais nous ne connaissons pas son point d'ancrage sur cette macromolécule (123). Elle a un poids moléculaire relativement faible (42.000 daltons) et ne représente que 7% du poids de la paroi. Cette protéine a fait l'objet de nombreuses études concernant sa composition en acides aminés, ses structures aussi bien secondaire que tertiaire, sa biosynthèse et son rôle biologique (94, 122, 45). On pense que cette protéine, qui réagit spécifiquement avec la portion Fc des γ G-globulines aurait un rôle pathogène (45). Les réactions inflammatoires dues aux staphylocoques débuteraient par une réaction entre la protéine A et ces γ G-globulines, car des souches contenant de grande quantité de cette protéine tendent à être plus résistante à la phagocytose que celles qui en possèdent moins ou pas du tout.

La protéine M, localisée dans les couches externes de la paroi des streptocoques du groupe A, confère à ces bactéries leur virulence en inhibant la phagocytose (57). Cette protéine est extraite par hydrolyse acide ainsi que par hydrolyse par la trypsine (22), ce qui démontre son mode de liaison covalent avec la paroi. Mais son point de fixation n'est pas connu. La protéine M a été très étudiée du fait de sa pathogénicité et il a été montré qu'elle était composée de plusieurs chaînes, de longueur variable et qui s'aggrègent suivant les conditions de pH (46). Elle représente 25% des protéines de la paroi (81). A côté de cette protéine M, ont été isolées les protéines R et T (22) qui ont été caractérisées par leur antigénicité.

Dans la deuxième catégorie de protéines, liées de façon non covalente à la paroi, celles de B. polymyxa (56, 95, 66). B. sphaericus (18, 67) et B. psychrophilus (2, 88, 5) ont été étudiées. Dans ces parois, les protéines sont en très grande quantité et forment une couche tout autour de la bactérie. Dans les parois de B. polymyxa et B. sphaericus, elles sont arrangées d'une façon telle qu'elles présentent des structures régulières détectables par microscopie électronique. Seule la protéine T de B. sphaericus (67) a été isolée et des études préliminaires ont été réalisées. Elle a un poids moléculaire élevé (140.000 daltons) et n'est composée que d'une seule chaîne peptidique. Signalons enfin que cette protéine est le site récepteur du phage M.

b) Bacteries gram-négatives.

Il a été depuis longtemps reconnu que des quantités importantes de protéines sont associées avec le peptidoglycane et la membrane externe de l'enveloppe des bactéries gram-négatives (47). Cependant, leur étude s'était heurtée à l'absence de méthodes convenables de préparation de parois débarrassées de membrane cytoplasmique. En effet, l'analogie de structure entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe d'une part, et l'existence de points d'adhérence entre elles, d'autre part, expliquent sans doute les difficultés rencontrées pour les séparer, sauf dans quelques rares exceptions (106, 139, 101). Récemment, des techniques permettant de séparer la membrane cytoplasmique et la membrane externe ont été mises au point (91, 92, 97, 62, 138).

Cependant, il est à noter qu'aucune de ces techniques ne conduit à la paroi proprement dite, puisqu'elles impliquent toutes la destruction plus ou moins complète du peptidoglycane. Par ailleurs, le complexe du peptidoglycane et des protéines qui y sont covalentiellement liées a été isolé et caractérisé (13, 104). Ainsi, la mise au point de ces différentes techniques de séparation et l'emploi systématique de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide a entraîné depuis quelques années un développement rapide de l'étude des protéines pariétales des bactéries gram-négatives, et avant tout, celle de E. coli.

Après isolement de la membrane externe de E. coli, qui contient 25% des protéines de toute l'enveloppe bactérienne, BRAGG et HOU (10) ont séparé quatre protéines et déterminé leurs poids moléculaire à 44.000, 34.000, 28.000 et 21.000 daltons. Par ailleurs, GARTEN et HENNING (48) ont isolé des fantômes de cette membrane externe qui sont formés par 25% de phospholipides, 25 à 30% de lipopolysaccharides et 45 à 50% de protéines. Ils ont montré que ces fantômes renfermaient une lipoprotéine, deux des protéines précédemment isolées par BRAGG et HOU (44.000 et 28.000 daltons) et d'une façon mineure, une protéine liée covalentiellement au

lipopolysaccharide, déjà caractérisée par WU et HEATH (140). D'autre part, il semblerait que la protéine de poids moléculaire 44.000 soit en fait formée par trois ou quatre protéines différentes (11, 117, 118).

Parmi ces protéines de la membrane externe, certaines sont liées covalentiellement au peptidoglycane. C'est le cas d'une lipoprotéine fortement hydrophobe, dont la partie protéique a un poids moléculaire de 7.500 daltons et dont la séquence en acides aminés a été déterminée (13, 15, 16, 12). Cette lipoprotéine se trouve en fait sous deux formes : une forme libre dans la membrane externe et une forme liée covalentiellement au peptidoglycane (74). BRAUN et BOSCH ont montré qu'elle avait la propriété de maintenir une cohésion entre le peptidoglycane et la membrane externe (12). D'après le modèle proposé par INOUYE (73), elle aurait éventuellement un rôle dans le transfert des molécules à travers la membrane externe. A côté de cette lipoprotéine, il existe une autre protéine liée covalentiellement au peptidoglycane, qui vient de faire l'objet d'une étude exhaustive par ROSENBUSCH (104). Cette protéine, de poids moléculaire 34.000 daltons forme une structure régulière mise en évidence par microscopie électronique, comme le font les protéines pariétales de certaines bactéries gram-positives (54). Le rôle de cette protéine n'a pas encore été déterminé.

En général, ces protéines de la membrane externe ont des rôles biologiques importants pour la bactérie, comme l'adsorption des phages (14) la fixation des colicines (14, 109, 116) et le maintien de la forme en bâtonnet (62, 61). La membrane externe contient aussi de nombreuses activités enzymatiques et parmi elles, la phospholipase A_1 (114) ainsi que les transférases de la biosynthèse des lipopolysaccharides (105).

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

A - Produits et enzymes commerciaux utilisés.

Produits et résines

Les réactifs utilisés sont des produits pour usages analytiques : urée (PROLABO, PARIS), chlorure de guanidinium (CARLO ERBA, ITALIE) recristallisé deux fois, bleu de Coomassie R 250 (MERCK) que nous avons utilisé spécifiquement pour sa plus grande sensibilité. Les gels de Séphadex (PHARMACIA, SUEDE) G_{25}, G_{50} et G_{100} la résine échangeuse d'ions, diéthylaminoéthyl-cellulose DE-32 (WHATMAN, ANGLETERRE) ont été utilisés et recyclés suivant les indications du fabricant.

Enzymes utilisés

Au cours de ce travail, nous avons utilisé les enzymes commerciaux suivants : trypsine de pancréas de bœuf (CHOAY, PARIS), chymotrypsine de pancréas de bœuf (CHOAY, PARIS), pronase (CALBIOCHEM, LOS ANGELES, E.U.), ribonucléase (KOCH-LIGHT laboratories, COLNBROOK-BUCKS, ANGLETERRE), désoxyribonucléase (SERVA, HEIDELBERG, R.F.A.), lysozyme de blanc d'oeuf (CALBIOCHEM, LOS ANGELES, E.U.), acide glutamique décarboxylase (KOCH-LIGHT laboratories COLNBROOK-BUCKS, ANGLETERRE), D-amino acide oxydase de rein de porc (BOEHRINGER, MANNHEIM, R.F.A.) et catalase de foie de bœuf (CALBIOCHEM, LOS ANGELES, E.U.).

B - Techniques analytiques.

Analyse quantitative en acides aminés et hexosamines

Les échantillons, après hydrolyse acide (HCl 6 N, 16 heures à 100° C) sont séchés sous vide en présence d'anhydride phosphorique et de pastilles de potasse. Les hydrolysats sont ensuite analysés à l'aide d'un appareil Multichrom BECKMAN, équipé de colonne de résine M-82 (long. colonne = 55 cm) pour les acides aminés neutres, acides et les hexosamines, et de résine M-71 (long. colonne = 7 cm) pour les acides aminés basiques. Les élutions des résines sont effectuées à 56° C par différents tampons selon les indications du constructeur. Par cette technique, on sépare nettement l'acide muramique de l'acide glutamique ainsi que l'acide diaminopimélique de la méthionine.

Dosages :

protéines

Le dosage est réalisé sur des échantillons contenant entre 0 et 30 µg de protéine, selon la méthode décrite par LOWRY et coll. (187). On utilise comme solution de référence, une solution de sérum albumine bovine. (CALBIOCHEM, LOS ANGELES, E.U.).

phosphore

Le phosphore total et le phosphore inorganique ont été déterminés par la méthode de CHEN et coll. (24) modifiée par DE SIERVO (29). Les échantillons doivent contenir entre 0 et 40 nmoles.

glucose

Les échantillons secs sont tout d'abord hydrolysés en tube scellé (HCl 2 N, 200 µl, 3 heures à 100° C), puis séchés sous vide en présence d'anhydride phosphorique et de pastilles de potasse. Le dosage du glucose est ensuite effectué par la méthode du glucostat (WORTHINGTON BIOCHEMICAL COMPANY, FREEHOLT, N.J., E.U.).

magnésium

Le magnésium a été dosé par absorption atomique à l'aide du spectrophotomètre PERKIN-ELMER 300.

lipides

La quantité de lipides de la paroi de B. subtilis cbl-1 a été déterminée par la méthode décrite par SALTON (111). La paroi (43,5 mg poids sec) est extraite une nuit par 5 ml d'acétone, à température ambiante. Après centrifugation, le culot séché est soumis à une hydrolyse acide (HCl 6 N, 16 heures, 100° C). On dilue ensuite à une normalité de 2 N, et on extrait 3 fois par de l'éther.

Les lipides totaux sont contenus dans l'ensemble, phase acétonique et phase éther, qui mises à sec, sont pesées.

sucres neutres

Les échantillons contenant de 0 à 20 µg de sucres neutres sont dosés selon la méthode de DUBOIS et coll. (32).

hexosamines

Les échantillons secs sont soumis à une hydrolyse acide (HCl 2 N, 200 µl, 3 heures à 100° C) puis séchés sous vide en présence d'anhydride phosphorique et de pastilles de potasse. Les hexosamines sont dosées selon la méthode de GHUYSEN et coll. (50).

sucres uroniques

Les échantillons contenant 5 à 100 µg de sucres uroniques sont dosés selon la méthode de DISCHE (30). On utilise comme solution de référence une solution d'acide glucuronique.

sucres réducteurs

Ce dosage a été réalisé par 2 méthodes différentes : pour les solutions par la méthode décrite par PARK et JOHNSON (98) et pour les suspensions par la méthode décrite par THOMPSON et SHOCKMAN (128).

glycérol

Les échantillons sont soumis à une hydrolyse acide (HCl 1 N, 3 heures, 100° C) puis séchés sous vide en présence d'anhydride phosphorique et de pastilles de potasse. Le dosage du glycérol est ensuite effectué selon la méthode enzymatique mise au point à l'Institut PASTEUR (KIT-Triglycérides-INSTITUT PASTEUR, PARIS).

groupements sulfhydriles

Les groupements sulfhydriles ont été dosés selon la méthode décrite par ELLMAN (36) à l'aide de l'acide 5-5' dithio-bis dinitrobenzoïque. En absence d'urée, ce réactif permet le dosage des groupements sulfhydriles libres et accessibles. En présence d'urée, il donne le nombre de groupements sulfhydriles totaux.

détermination des groupements amides des peptides

On détermine la quantité d'ammoniaque libérée après hydrolyse totale du peptide (HCl 6 N, 16 heures à 100° C). L'échantillon témoin est préparé en mettant à sec une quantité d'acide chlorhydrique identique à celle utilisée pour l'hydrolyse et en ajoutant ensuite la même aliquote de peptide à analyser. Les quantités d'ammoniac contenues dans l'échantillon à doser et dans l'échantillon témoin sont déterminées à l'aide de l'appareil Multichrom BECKMAN (résine M-71, longueur de colonne = 7 cm) à t = 56° C. La différence, entre les quantités d'ammoniac trouvées dans les échantillons, donne le nombre de groupements amides présents dans le peptide.

Dosage qualitatif et quantitatif des groupements N-terminaux

groupements aminés libres

Ce dosage a été réalisé selon la méthode préconisée par LOWRY (86). Les échantillons contenant 5 à 25 nmoles de groupements aminés sont incubés en présence de 20 µl de borate de potassium 1% et de dinitrofluorobenzène pendant 30 minutes à 60° C, puis additionné d'acide chlorhydrique 2 N. On lit l'absorbance à 420 nm.

acides aminés N-terminaux

Pour identifier les acides aminés N-terminaux et déterminer leur quantité, nous avons utilisé la technique de dinitrophénylation selon JARVIS et STROMINGER (75). Nous avons détecté les dérivés dinitrophénylés par :

a) par chromatographie sur couches minces de gel de silice selon GHUYSEN (50).

Les hydrolysats acides sont additionnés de 50 µl d'eau et extraits trois fois par de l'éther. Le dérivé DNP-Ala est soluble dans l'éther tandis que le dérivé mono-DNP-DAP ne l'est pas. L'extrait par l'éther est mis à sec puis repris trois fois par 25 µl de méthanol et déposé sur une plaque de gel de silice. La chromatographie est développée dans le solvant : chloroforme/méthanol/acide acétique - 88/10/2 (V/V). On sèche la plaque. On prélève la partie de silice contenant le dérivé DNP-Ala, le dérivé est ensuite élué par le mélange méthanol-ammoniaque 0,01 M (1/1), et dosé à l'aide d'un spectrophotomètre GILFORD à 340 nm. On réalise en même temps, comme référence la dinitrophénylation de 50 nmoles d'alanine.

Pour l'extraction du dérivé mono-DNP-DAP, on dilue jusqu'à une teneur en acide chlorhydrique 2 N et on fait ensuite trois extractions par du n-butanol saturé d'eau. Les extraits sont séchés sous vide puis repris par du méthanol et chromatographiés sur plaque de gel de silice dans le solvant : alcool benzylique/chloroforme/eau/ammoniaque concentré - 30/30/30/6/2 (V/V). Le dérivé, après avoir été élué de la plaque, est dosé dans un spectrophotomètre GILFORD à 340 nm. Un échantillon de référence de mono-DNP-DAP est traité dans les mêmes conditions.

b) dosage à l'aide de l'appareil Multichrom BECKMAN .

On prélève deux échantillons identiques de peptide à analyser. Un échantillon est soumis à une réaction de dinitrophénylation selon la méthode décrite précédemment. Les deux échantillons sont séchés puis hydrolysés (HCl 6 N, 16 heures à 100° C) puis à nouveau séchés. Ils sont ensuite

analysés à l'aide de l'appareil Multichrom BECKMAN comme précédemment Pour les dérivés alanine et acide diaminopimélique en position N-terminale, nous avons rapporté leur quantité à l'acide glutamique. En effet, au cours de la dinitrophénylation, la quantité d'acide glutamique ne varie pas.

hydrolyse des échantillons

Tous les échantillons ont été hydrolysés par de l'acide chlorhydrique 6 N pendant 16 heures à 100° C.

Détermination de la configuration des acides aminés

- détermination de la D-alanine selon GHUYSEN (50).

Aux échantillons secs hydrolysés, on ajoute 50 µl de pyrophosphate 0,1 M pH 8,3 contenant par millilitre 5 µl de catalase (20 mg/ml) et 20 µl de D-amino-acide oxydase (5 mg/ml). Après avoir mélangé, on incube 3 heures à 37° C. Un témoin ne contenant que les solutions d'enzymes est incubé dans les mêmes conditions. On détermine la quantité de D-alanine par différence entre les quantités totales d'alanine des peptidoglycanes soumis et non soumis à l'hydrolyse enzymatique. La détermination est faite à l'aide de l'appareil Multichrom BECKMAN.

- Configuration de l'acide glutamique.

La détermination est faite sur des hydrolysats de peptidoglycane. Une aliquote contenant 100 à 300 nmoles d'acide glutamique est incubée avec 100 µg de décarboxylase de l'acide L-glutamique dans 250 µl de tampon acétate 0,05 M pH 5,5 pendant 3 heures à 37° C. Le dosage d'acide glutamique est fait à l'aide de l'appareil Multichrom BECKMAN par différence entre deux échantillons soumis et non soumis à l'action enzymatique.

- Configuration de l'acide diaminopimélique.

La détermination est faite sur des hydrolysats de peptidoglycane. RHULAND (100) a pu séparer le dérivé LL-DAP des dérivés DL-racémique

et meso-DAP par chromatographie sur papier dans le système de solvant : méthanol/pyridine/acide chlorhydrique 10 N/eau -(V/V) 80/10/2,5/7,5. Nous avons modifié cette technique en utilisant une chromatographie sur plaque de cellulose en répétant deux fois le développement dans le même solvant.

Pour distinguer les isomères DD- et meso-DAP, nous avons employé la méthode préconisée par JUSIC et coll. (76) qui consiste à chromatographier les dérivés dinitrophénylés de cet acide aminé sur papier Schleicher Schüll n° 2043 b préalablement traité au tampon phtalate 0,1 M pH 6. Le développement se fait dans le système de solvant : 1,5 M Na_2SO_4 dans du phtalate de potassium 0,05 M.

Dosage du glucosaminitol et du muramicitol selon HAJA et MATSUSHIMA (58)

Des échantillons contenant de la glucosamine et de l'acide muramique séchés sont réduits par 100 µl de borohydrure de sodium (3,8 mg/ml) pendant 8 heures à pH 8, puis hydrolysés. L'hydrolysat obtenu est analysé à l'aide d'un appareil Multichrom BECKMAN équipé d'une colonne de résine M-82 (55 cm de longueur). Les analyses sont faites à 45° C et la résine est éluée par les tampons : pH 3,12 et 4,12. Dans ces conditions, on peut séparer l'acide muramique, le muramicitol, la glucosamine et le glucosaminitol. Le glucosaminitol qui a servi comme standard a été préparé par réduction de la glucosamine par la méthode que nous venons de décrire. Le muramicitol nous a été donné gracieusement par Monsieur J.M. PETIT (Faculté des Sciences, La Source, ORLEANS, FRANCE). Nous avons noté que le muramicitol est 10 fois moins sensible à la ninhydrine que l'acide muramique.

Electrofocalisation

L'électrofocalisation permet de séparer les protéines sur un gradient de pH. Cette technique, appliquée à la partie protéique de la paroi

de B. subtilis cbl-1, a été réalisée avec une colonne LKB 8101 pendant 48 heures, à 300 volts avec de l'ampholine 2,5 % (zone de pH 3 à 5).

Détermination du poids moléculaire.

Le poids moléculaire de la protéine de B. subtilis cbl-1 a été déterminé par vitesse de sédimentation à l'équilibre selon la technique de YPHANTIS (147). Pour cela, on dissout la protéine dans du tampon phosphate 0,2 M pH 7. On admet une valeur de 0.77 ml/gr comme volume spécifique. Les différents équilibres sont établis à l'aide de colonnes de 0,23 cm présentant un fond artificiel de F.C. 43 (perfluorotributylamine, MINNESOTA MINNING and MANUFACTURING COMPANY). Le rotor est accéléré à 20.000 rev/mn à 10° C.

Electrophorèses sur gel de polyacrylamide.

- Gels en présence de dodécylsulfate de sodium

Les échantillons de protéines sont incubés de deux façon différentes :

- selon la méthode de WEBER et coll. (135) : les échantillons sont additionnés de tampon phosphate 0,01 M pH 7 contenant du dodécylsulfate de sodium à 1%, avec ou sans 2-mercaptoéthanol 1% , puis sont chauffés 2 minutes à 100° C.

- selon la méthode de BRAGG et HOU (11) : les échantillons sont dissous dans le mélange dodécylsulfate de sodium à 1% - urée 4 M - 2-mercaptoéthanol 1% , puis incubés 1 heure à 37° C et ensuite chauffés 3 minutes à 100°C.

Les électrophorèses sont ensuite réalisées sur des gels de 5, 7,5 et 10% de polyacrylamide contenant 0,1% de dodécylsulfate de sodium, préparés selon la technique de WEBER et coll.

- Gels en urée

Les échantillons de protéines sont pré-traités par de l'urée 8 M 10 mn à température ambiante. Les électrophorèses sont réalisées sur des gels à 4% en polyacrylamide contenant de l'urée 8 M et préparés par la méthode de HEDRICK et SMITH (60).

- Coloration et décoloration des gels

Après électrophorèse, les protéines sont fixées dans le gel par de l'acide trichloracétique à 12,5% puis colorées par le bleu de coomassie et ensuite décolorées par de l'acide trichloracétique à 10%, selon la technique décrite par CHRAMBACH (25). Dans certains cas, les gels ont été enregistrés à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre GILFORD muni d'un lecteur de gel.

Comptage de la radioactivité.

Le comptage est réalisé en scintillation liquide dans un spectrophotomètre PACKARD TRI-CARB dans le système de solvant de KAUFMAN et coll. (77) : 2 ml d'eau additionné de 13 ml de solution de dioxane. Cette solution contient, pour 1 litre de dioxane, 6 g de PPO (2,5-diphényloxazol), 300 mg de p-POPOP (p-bis-2,5-phényloxazoyl-1-benzène) et 100 g de naphtalène.

Solvants de chromatographie sur couches minces.

. Solvant S_1 : acide isobutyrique/ammoniaque (V/V) 5/3
. Solvant S_2 : méthanol/acide acétique/eau (V/V) 4/1/5
. Solvant S_3 : n-butanol/acide acétique/eau (V/V) 4/1/5 (phase supérieure).

C - Techniques bactériologiques.

Cultures de B. subtilis 168 wt et B. subtilis cbl-1

B. subtilis 168 wt et B. subtilis cbl-1 sont cultivées à 37° C, sous forte agitation, dans un milieu décrit précédemment (124) (Volume liquide/volume flacon = 1/10)

Comptage des bactéries

Le comptage est fait dans un compteur "Coulter" muni d'une cellule

de 30 μ de diamètre et de 50 μl de volume. Les bactéries sont amenées à une dilution convenable dans une solution 0.85% NaCl-2,5% formaline préalablement filtrée sur un filtre Millipore Ha 0,45 μ (Millipore Filter Corp. USA).

Préparation des parois

Les bactéries, en suspension dans l'eau froide, sont additionnées de bille de verre (diamètre : 120 μ) puis cassées dans un homogénéiseur BRAUN pendant 4 minutes sous refroidissement par CO_2 liquide. Après filtration sur verre frité sous vide pour éliminer les billes de verre, on centrifuge à 4000 g pendant 10 minutes. Le culot (bactéries entières plus débris) est écarté et le surnageant contenant les parois est centrifugé 10 minutes à 40.000 g. Les parois ainsi obtenues sont lavées 6 à 8 fois par de l'eau, à 0° C, puis conservées à -20°C.

D - Techniques biochimiques

Autolyse des parois

Les parois de B. subtilis cbl-1 sont suspendues à une concentration de 2 mg/ml dans un tampon acétate d'ammonium 0,05 M pH 6,6 puis incubées à 37° C. On suit l'autolyse en mesurant la décroissance de densité optique à 600 nm.

Isolement du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1

Les bactéries conservées à -20° C sont remises en suspension dans du dodécylsulfate de sodium à 2% puis agitées pendant 20 mn à température ambiante. Le mélange est ensuite homogénéisé aux Turrax pendant 5 mn. Après centrifugation (30 mn à 50.000 g) le culot est traité par le mélange enzymatique : désoxyribonucléase et ribonucléase à pH 7,2 dans le tampon phosphate 0,1 M en présence d'ions magnésium et lavé. On obtient un peptidoglycane contenant encore quelques protéines que l'on élimine par action du chlorure de lithium 6 M suivie de l'action de la trypsine et de la pronase (incubation à 37° C dans le tampon Tris 0,1 M pH 8,2), et le polymère de galactosamine et glucosamine.

Inactivation par la chaleur.

1- Parois de B. subtilis cbl-1 et de B. subtilis 168 wt.

Les parois en suspension dans l'eau sont chauffées pendant 20 minutes à 100° C. On s'assure que les parois, après ce traitement, ne s'autolysent plus en vérifiant que l'absorbance à 600 nm est restée constante.

2- Peptidoglycane

Une suspension de peptidoglycane dans l'eau est versée goutte à goutte dans de l'eau à 100° C et le mélange est laissé ensuite 5 minutes à cette température. Le peptidoglycane est ensuite obtenu par centrifugation 20 minutes à 50.000 g.

Préparation de protoplastes de B. subtilis cbl-1

Les protoplastes de B. subtilis cbl-1 ont été préparés par la méthode de KONINGS et coll. (80). Les cellules sont suspendues (1g/80 ml) dans un tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 8 contenant 20% de sucrose. On ajoute du lysozyme à une concentration finale de 300 µg/ml et le mélange est incubé 30 minutes à 37° C. Les protoplastes formés sont récoltés par centrifugation à 4° C (30 minutes à 14.000 g). Le surnageant et le culot sont ensuite dialysés contre du tampon phosphate 0,05 M pH 7.

Préparation des membranes.

Les membranes de B. subtilis 168 wt et de B. subtilis cbl-1 ont été préparées par la méthode de HUGHES et coll. (69).

Les cellules sont suspendues (1g/10ml) dans du tampon Tris 0,05 M pH 7,5 contenant de l'éthylènediaminetetracétate 10^{-3} M, avec du lysozyme (1 mg/ml), de la ribonucléase (5 µg/ml) et de la désoxyribonucléase (5 µg/ml). L'incubation a lieu à 37° C jusqu'à une lyse complète des bactéries (observée à l'aide d'un microscope). Les membranes sont récoltées par centrifugation à 25.000 g pendant 20 minutes puis lavées une fois avec le tampon d'incubation, deux fois avec du tampon pyrophosphate de sodium 0,15 M pH 7,5 et une fois avec du tampon Tris 0,05 M pH 7,5. Les mem-

branes obtenues sont ensuite suspendues dans un tampon Tris 0,05 M pH 7,5 contenant 10^{-3} M de thioglycollate de sodium et elles sont conservées à -20° C.

Essai enzymatique pour la CDP-glycérol-polyglycérolphosphate transférase.

La réaction a été faite d'après la méthode de HUGHES et BADDILEY (69). On réalise le mélange : 5 µl CDP-glycérol-^{14}C (17000 cpm), 10 µl tampon Tris pH 7,5 contenant de l'EDTA 10^{-3} M et 2 µl de chlorure de magnésium 1 M. Le mélange est mis à sec, puis additionné de 100 µl de suspension de membranes (7 mg protéine/ml) et incubé 1 heure à 37° C. On arrête la réaction en ajoutant 4 µl d'acide perchlorique 3 N et on centrifuge (3000 g, 10 minutes). Le culot est lavé 3 fois par 100 µl d'acide perchlorique 0,15 N puis dissous dans 100 µl d'ammoniaque 0,3 M. On compte ensuite la radioactivité. Chaque essai est fait en double. On fait, par ailleurs, deux témoins dans lesquels on remplace les 100 µl de suspension de membranes par 100 µl de la même suspension préalablement traitée 10 minutes à 100° C.

Techniques immunochimiques

Les expériences d'immunochimie ont été réalisées par le Docteur M. KAMINSKI (Laboratoire d'Enzymologie du CNRS, Gif-sur-Yvette).

Des lapins adultes mâles, pesant 3 Kgs, sont inoculés deux fois, à 3 semaines d'intervalle par injection sous-cutanée dans la région dorsale, avec 1 ml d'immunogène mélangé à 1 ml d'adjuvant complet de Freund. Six semaines après, une injection sous-cutanée de l'immunogène seul est réalisé . La ponction de sang a lieu une semaine plus tard. Les immunogènes suivants ont été réalisés :

. paroi entière B. subtilis cbl-1 (20 mg protéine par injection) :

. protéine purifiée de la paroi : (0,75 mg protéine par injection) ;

. extrait total de B. subtilis 168 wt.

Les immunosera ont été utilisés non dilués et non fractionnés. Des précipitations avec double immunodiffusion, basées sur la méthode de OUCHTERLONY ont été réalisées sur des gels d'agarose 0,8% dilués soit avec du chlorure de sodium 0,15 M, soit avec du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4. Différents arrangements de puits d'antisérum et d'antigène ont été utilisés. Les lignes de précipitation se développent en 48 heures, temps pendant lesquels les empreintes de contact sont prises, aussi bien qu'après la coloration finale.

CHAPITRE II

MORPHOLOGIE ET CARACTERISATION CHIMIQUE DE LA PAROI DE B. subtilis cbl-1.

Dans ces études, que ce soit en microscopie électronique ou que ce soit pour les analyses chimiques nous avons utilisé la souche B. subtilis 168 wt comme terme de comparaison.

A - Microscopie électronique*

a) Bactéries entières

Les deux souches B. subtilis cbl-1 et B. subtilis 168 wt ont été examinées par microscopie électronique (130). Après fixation par le tétroxyde d'osmium selon RYTER et KELLENBERGER (108), les deux bactéries ont des images très différentes (figures 1a et 1b). La paroi de B. subtilis cbl-1 est en partie détruite. Elle présente une couche interne de 4 nm d'épaisseur près de la membrane cytoplasmique ainsi qu'une couche de 11 nm d'épaisseur séparée de la première par une zone de largeur variable. Les cellules semblent très longues et le septum est mal défini. Au contraire, la paroi de B. subtilis 168 wt apparaît homogène, dense en électrons et le septum est bien défini.

Si la fixation est effectuée par le glutaraldéhyde à 5% dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,2, il n'apparaît aucune différence morphologique entre les deux bactéries. La paroi de B. subtilis cbl-1 ne semble avoir subi aucune modification.

Si la fixation est réalisée par le glutaraldéhyde 5% dans le

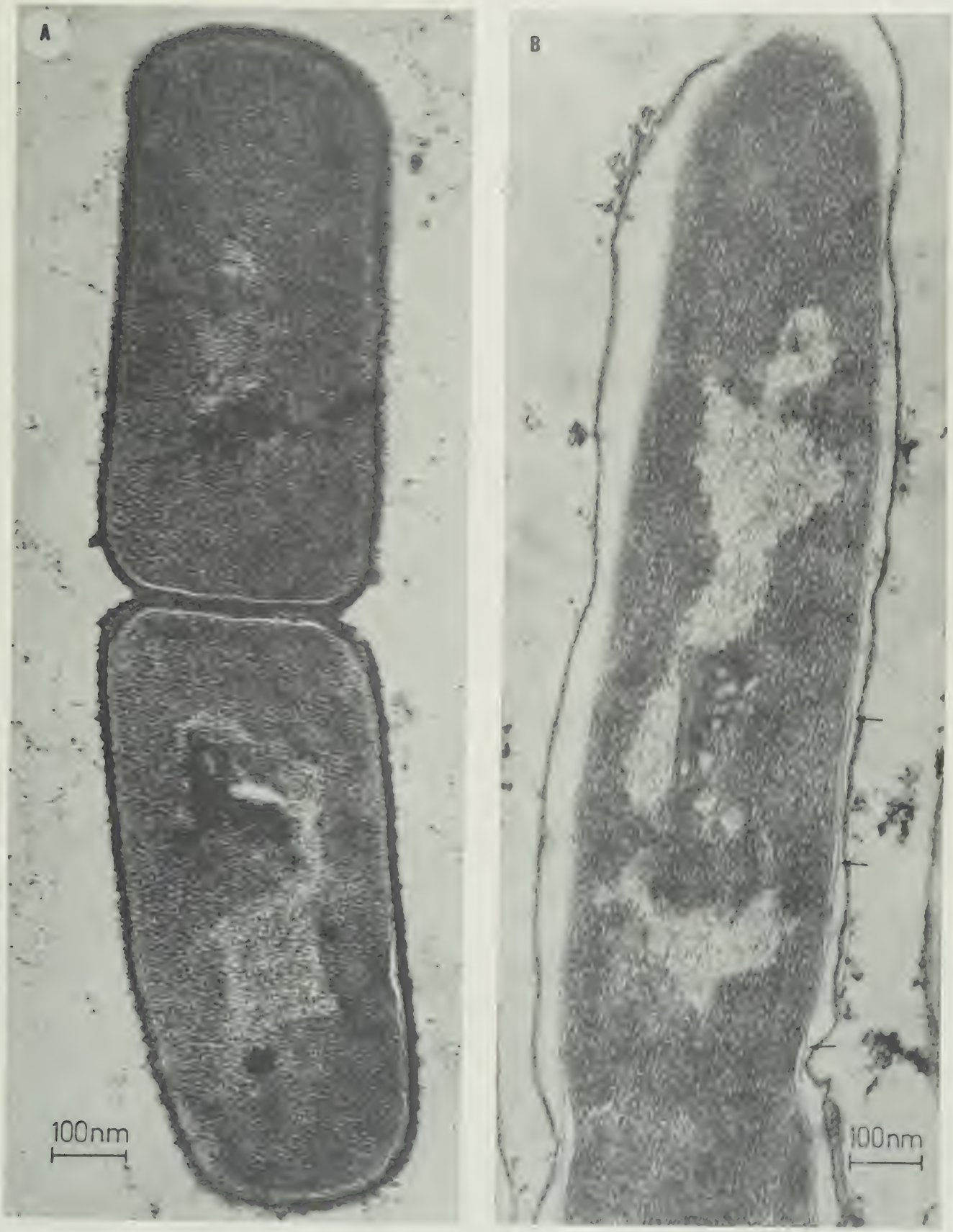
---

* Nous remercions très vivement Monsieur J. LAPORTE (Laboratoire d'enzymologie du CNRS, Gif-sur-Yvette) et Mademoiselle ROUSSEAU (CNRZ, Jouy-en-Josas) pour les images obtenues au cours de cette étude.

FIGURE 1

a - Microscopie électronique de Bacillus subtilis 168 wt fixé par traitement avec le tétroxyde d'osmium.

b - Microscopie électronique de Bacillus subtilis cbl-1 fixé par traitement avec le tétroxyde d'osmium.


A
100nm
B
100nm

tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 suivie d'une fixation par le tétroxyde d'osmium dans le tampon véronal pH 6, les images des deux bactéries sont à nouveau différentes. La paroi de B. subtilis cbl-1 n'est pas détruite, mais présente une structure en triple couche (figure 4a). La paroi de B. subtilis 168 wt a la même image qu'avec les traitements précédents.

Etant donné ces différences morphologiques, nous avons examiné les parois des deux bactéries pour avoir plus de précisions sur ces structures.

b) Parois

Après fixation par le tétroxyde d'osmium, les images des parois sont très différentes : la paroi de B. subtilis 168 wt est épaisse (16 nm), tandis que celle de B. subtilis cbl-1 est mince (3,5 nm) et évanescente (figures 2a et 2b). Ces deux parois sont, au contraire, semblables après fixation par le glutaraldéhyde, montrant une seule couche dense en électrons (figures 3a et 3b). Et si nous combinons les deux fixations, nous retrouvons une structure en triple couche pour la paroi de B. subtilis cbl-1 (figure 4b) et une structure homogène et épaisse pour la paroi de B. subtilis 168 wt.

D'après cette étude au microscope électronique, nous voyons que ces parois ont donc des morphologies très différentes.

Cette différence existe encore quand nous utilisons les colorations de THIERY (127) et de RAMBOURG (99) qui colorent spécifiquement les polysaccharides (figures 5, 6, 7). Les images obtenues montrent que la paroi de B. subtilis cbl-1 semble contenir une teneur faible de ces polymères.

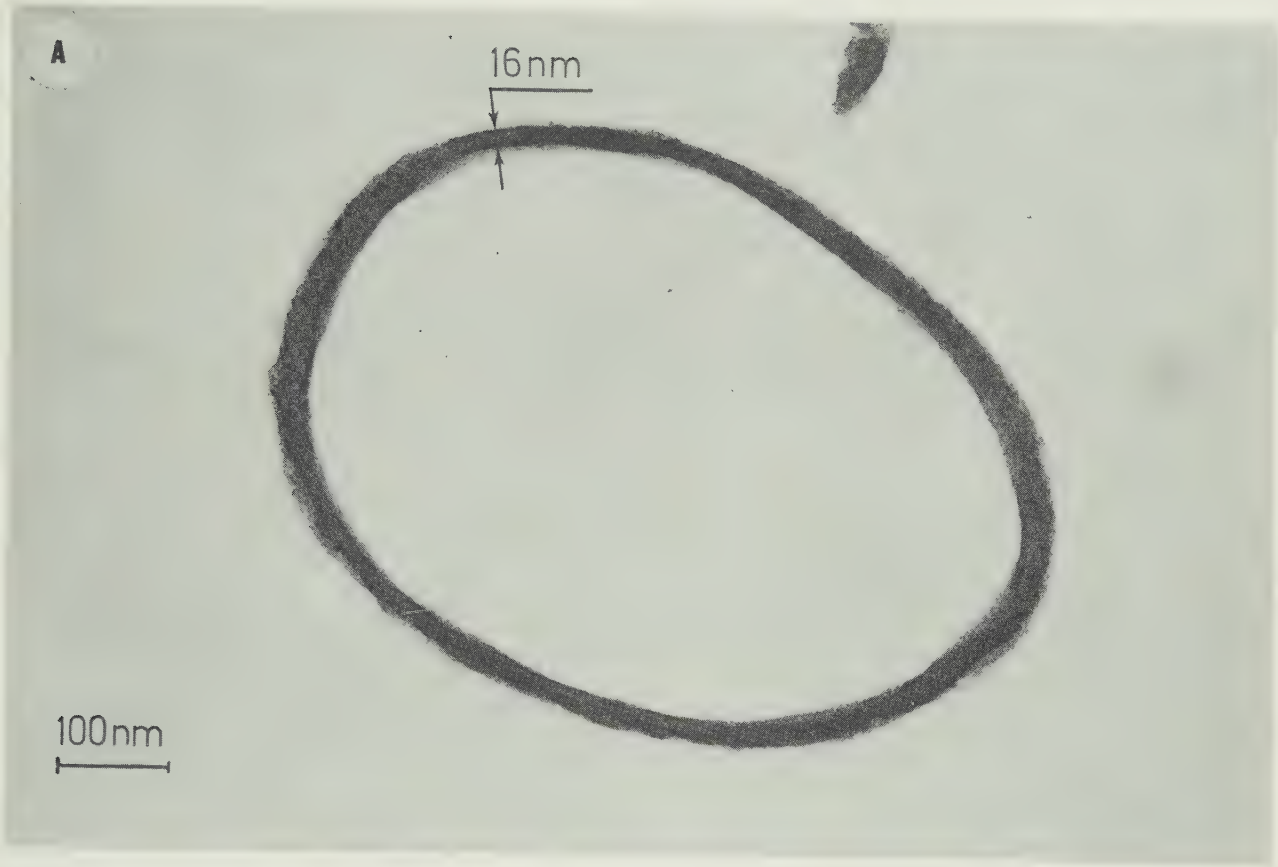
B - Composition chimique de la paroi de B. subtilis cbl-1.

Les différences morphologiques observées nous ont amenés à comparer les parois des deux souches, du point de vue de leur composition chimique en déterminant leur teneur en protéines, phosphate,

FIGURE 2

a - Microscopie électronique des parois de Bacillus subtilis 168 wt après fixation avec le tétroxyde d'osmium. Epaisseur : 16 nm.

b - Microscopie électronique des parois de Bacillus subtilis cbl-1 après fixation avec le tétroxyde d'osmium. Epaisseur : 3,5nm.


A
16nm
100nm

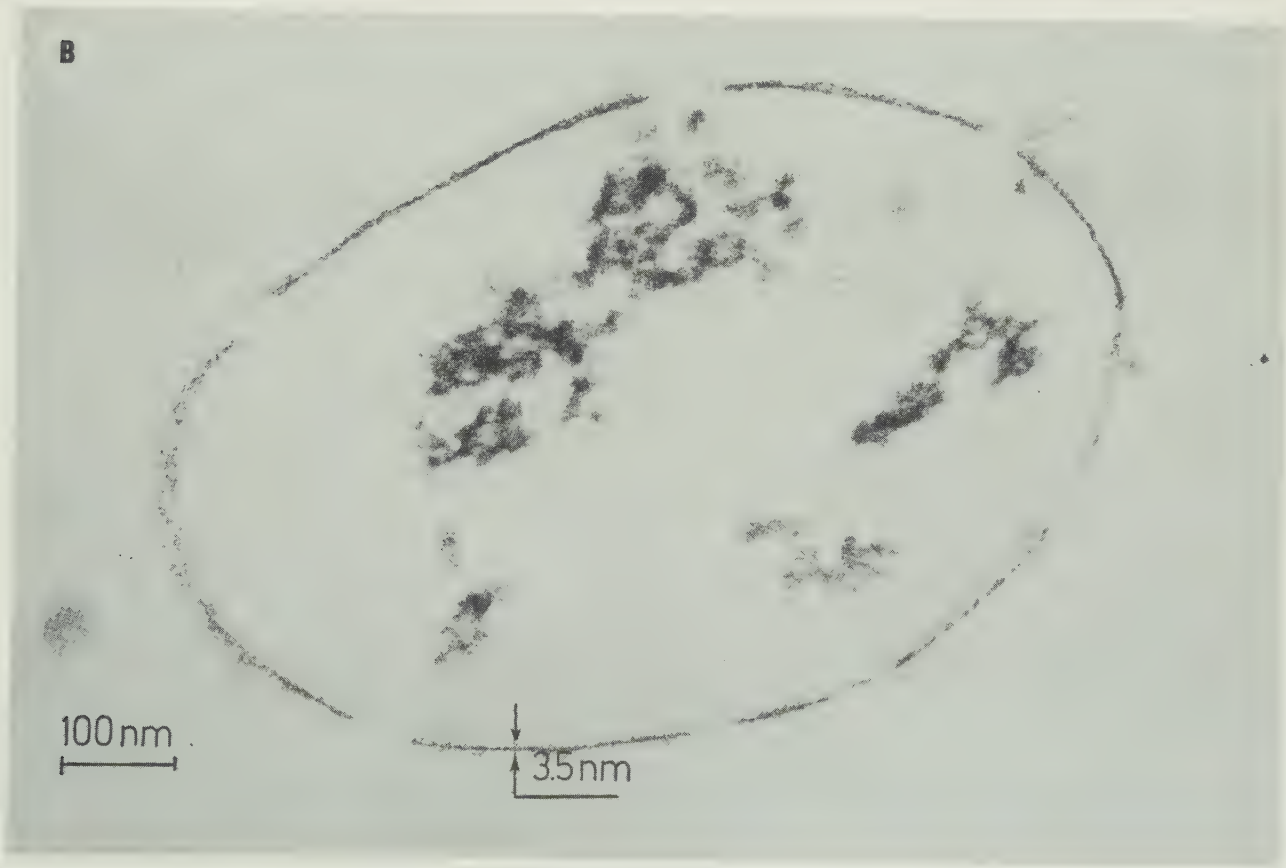

B
100nm
3.5nm

FIGURE 3

a - Microscopie électronique des parois de Bacillus subtilis 168 wt fixée après traitement avec le glutaraldéhyde. Epaisseur : 23 nm.

b - Microscopie électronique des parois de Bacillus subtilis cbl-1 fixée après traitement avec le glutaraldéhyde. Epaisseur : 20 nm.

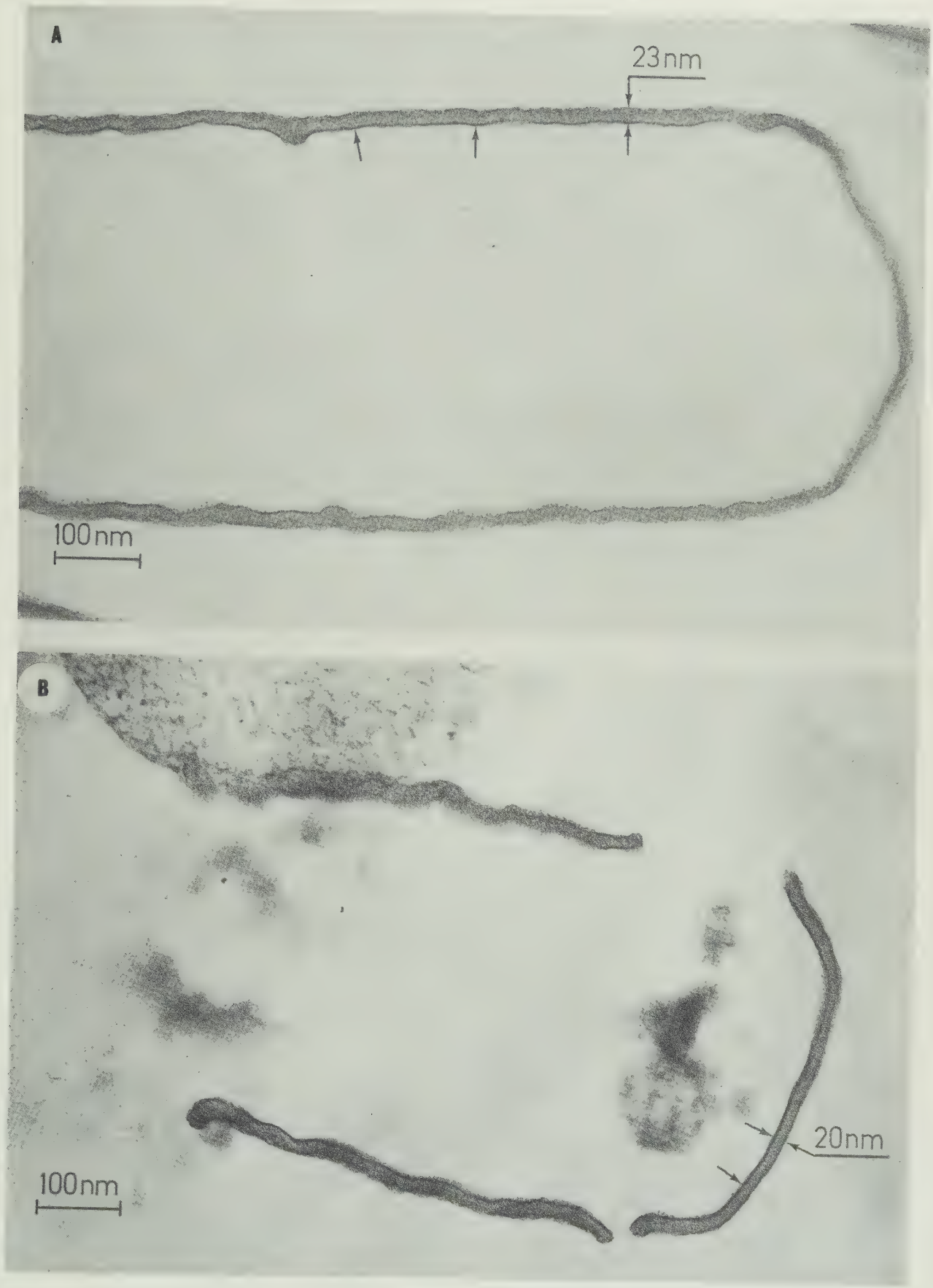
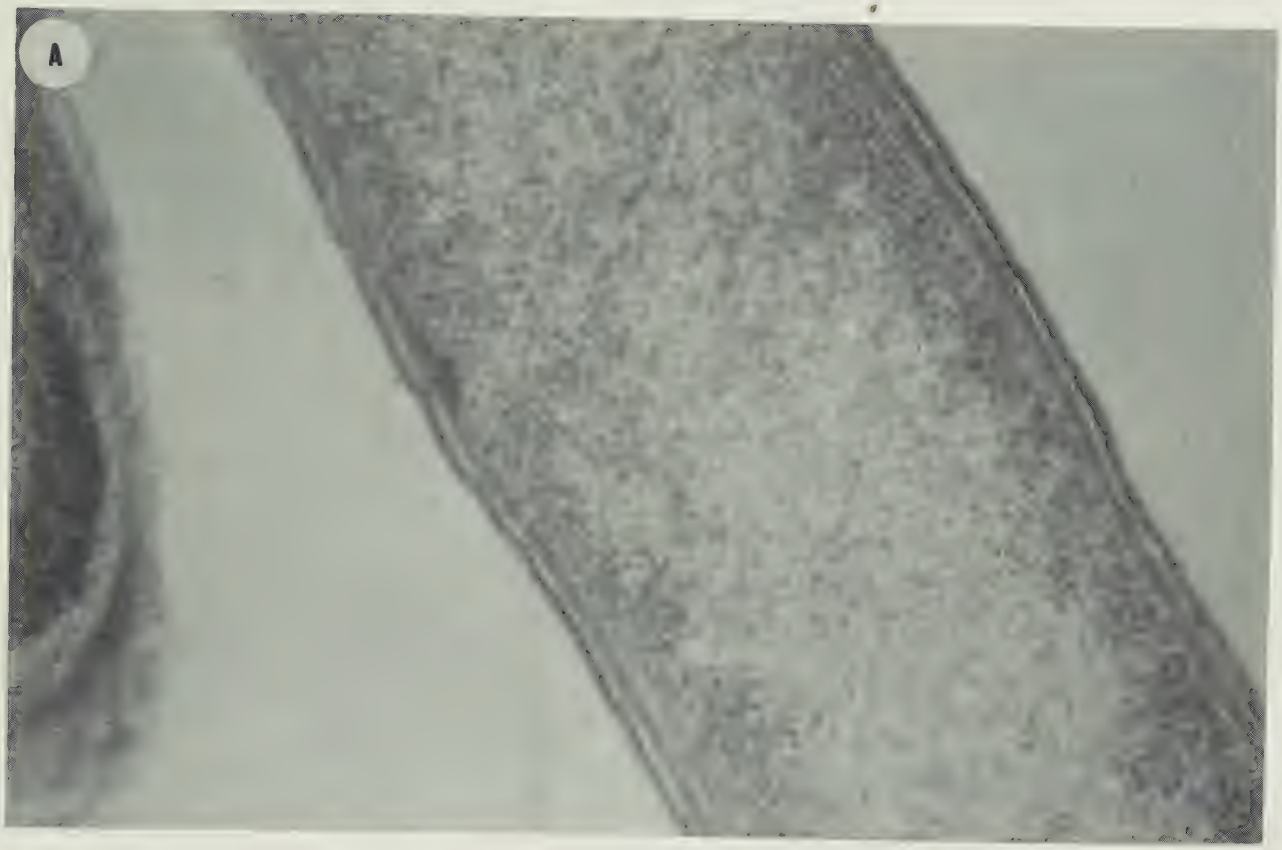

A
23nm
100nm
B
20nm
100nm

FIGURE 4

a - Microscopie électronique de bactérie entière de B. subtilis cbl-1 après double fixation par le glutaraldéhyde 5% et le tétroxyde d'osmium.

b - Microscopie électronique des parois de Bacillus subtilis cbl-1 après double fixation par le glutaraldéhyde 5% et le tétroxyde d'osmium.

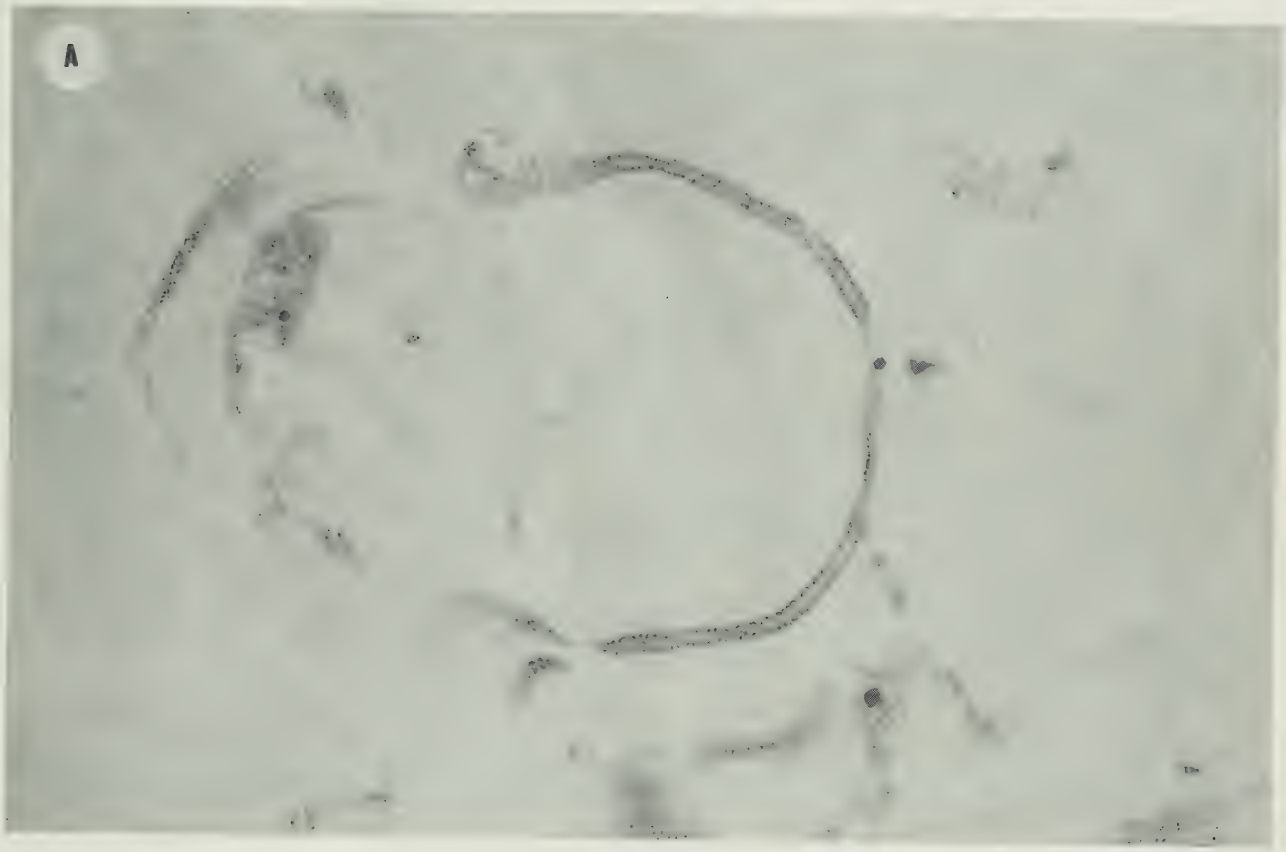

A

B

FIGURE 5

a - Microscopie électronique des parois de B. subtilis 168 wt après double fixation par le glutaraldéhyde conjugué au tétroxyde d'osmium et coloration selon THIERY.

b - Microscopie électronique des parois de B. subtilis cbl-1 après double fixation par le glutaraldéhyde conjugué au tétroxyde d'osmium et coloration selon THIERY.


A

B

FIGURE 6

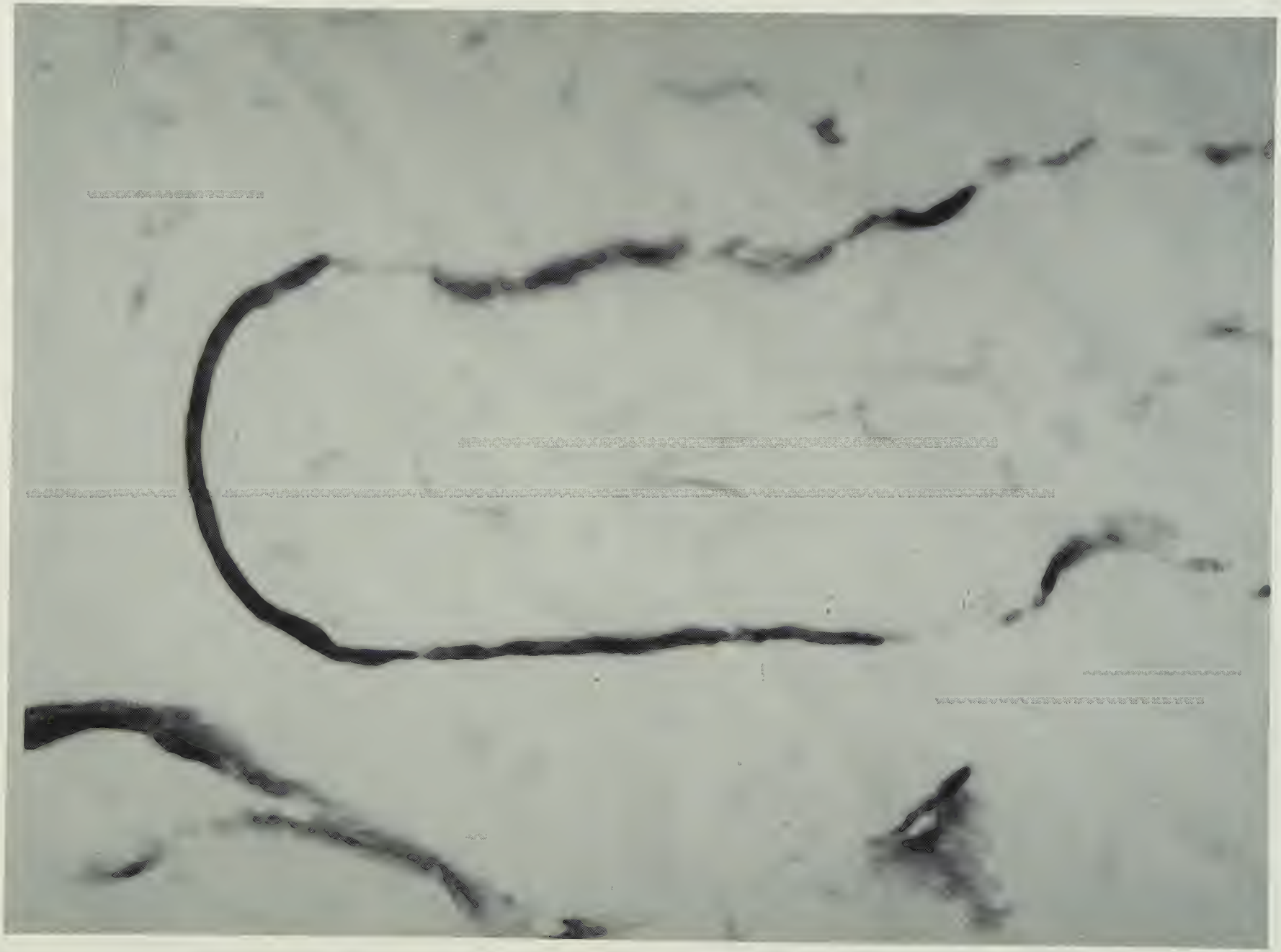
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE PAROIS DE B. subtilis chi-1.

Les parois ont été fixées par le glutaraldéhyde et le tétroxyde d'osmium puis colorées selon la technique de RAMBOURG.

FIGURE 7

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE PAROIS DE B. subtilis 168 wt.

Les parois ont été fixées par le glutaraldéhyde et le tétroxyde d'osmium puis colorées selon la technique de RAMBOURG.



glucose, lipides et leur composition en acides aminés et hexosamines. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux (I) et (II) et montrent que les protéines représentent, en poids, 75% de la paroi et que la quantité de phosphate est faible (0,2%).

Le phosphate dans les parois de B. subtilis est surtout caractéristique des acides téichoïques, polymères de glycérolphosphate substitués par du glucose et de l'alanine. La valeur obtenue pour le dosage du phosphore indique clairement que ces polymères n'existent pas dans les parois de B. subtilis cbl-1. Ce fait est d'ailleurs confirmé par les dosages de glucose et d'alanine. En effet, la teneur en glucose est extrêmement basse et la quantité d'alanine est très diminuée comparée à celle obtenue avec les parois de la souche B. subtilis 160 wt.

Le peptidoglycane, caractérisé par le taux d'acide diaminopimélique, ne représente qu'environ 9% en poids de cette paroi, ce qui est faible en comparaison de la paroi de B. subtilis prise comme référence où il en représente 35% du poids sec. D'autre part, la quantité de lipides que nous avons obtenu à partir de la paroi de B. subtilis cbl-1 correspond à celle que SALTON a trouvée chez B. subtilis (111). Le test de GRAM réalisé sur B. subtilis cbl-1 a montré qu'il s'agissait bien d'une bactérie gram-positive.

C - Corrélation des résultats de microscopie électronique et des données analytiques.

Nous avons effectué une série de dosages, avant et après fixation de la paroi par le tétroxyde d'osmium pour déterminer l'effet de ce traitement. Les résultats obtenus (cf. Tableau III) montrent que la fraction protéique est en très grande partie éliminée alors que le peptidoglycane n'est que partiellement dégradé. La structure mince et évanescente (cf. figure 2b) restante après traitement de la paroi par le tétroxyde d'osmium correspond donc, sans doute, au peptidoglycane. Le prétraitement par le glutaraldéhyde semble protéger les protéines. En effet, la double fixation par le glutaraldéhyde conjugué au tétroxyde d'osmium révèle une structure

TABLEAU I

COMPOSES	B. subtilis 168wt	B. subtilis cbl-1
(mg/100 mg paroi)		
Phosphore	4,9	0,2
Protéines	6	75
Lipides	0.7 *	3,8
(nmoles/mg paroi)		
Glucose	1250	40
Hexosamines	726	506
Acide diaminopimélique	353	97
Alanine	932	469
Acide glutamique	405	448
Valine	33	230

Composition chimique des parois de Bacillus subtilis cbl-1 et de Bacillus subtilis 168 wt.

* valeur trouvée par SALTON

TABLEAU II

Composés (nmoles/mg) paroi	Parois non traitées
Asp	592
Thréo	292
Ser	256
Glu	448
Gly	307
Ala	469
Val	230
Ileu	103
Leu	263
Mur	99
DAP	99
Glc	223
Gal	117
Lys	292
His	27
Arg	92

Composition totale en amino-acides et en amino-sucres de la paroi de B. subtilis cbl-1, obtenue après hydrolyse acide.

ou triple couche formée par deux couches similaires enfermant une couche médiane mince plus dense (cf. figures 4a, 4b et 8). De plus, nous notons que dans ce mode de fixation, malgré le prétraitement au glutaraldéhyde, le tétroxyde d'osmium semble provoquer un léger décollement de ces deux couches externes (cf. figure 4b).

Nous pouvons donc en conclure que la fraction protéique, vue sa grande labilité au tétroxyde d'osmium et vue son importance pondérale, correspond sans doute aux deux couches épaisses situées de part et d'autre de la couche médiane dense qui serait le peptidoglycane.

L'ensemble des résultats obtenus par ces dosages ainsi que les observations au microscope électronique mettent en évidence la structure originale que doit avoir la paroi de B. subtilis cbi-1. Pour étudier une telle structure, nous allons avoir à résoudre un problème peu commun dans l'étude d'une paroi : séparer la partie protéique des autres polymères, la purifier et étudier sa structure ; mais aussi des problèmes plus classiques : l'étude de la structure globale du peptidoglycane et des polysaccharides qui lui sont liés, ainsi que l'étude du système autolytique.

TABLEAU III

COMPOSES	B. subtilis 168 wt		B. subtilis cbl-1	
	avant	après	avant	après
(mg/100 mg paroi initiale)				
Protéine	12	10	75	14
Phosphore	4,9	2,4	0,22	0,35
(nmoles/mg paroi)				
Hexosamines	726	650	506	400
Acide diaminopimélique	353	114	97	33

Composition chimique des parois de Bacillus subtilis cbl-1 et de Bacillus subtilis 168 wt, avant et après traitement par le tétroxyde d'osmium.

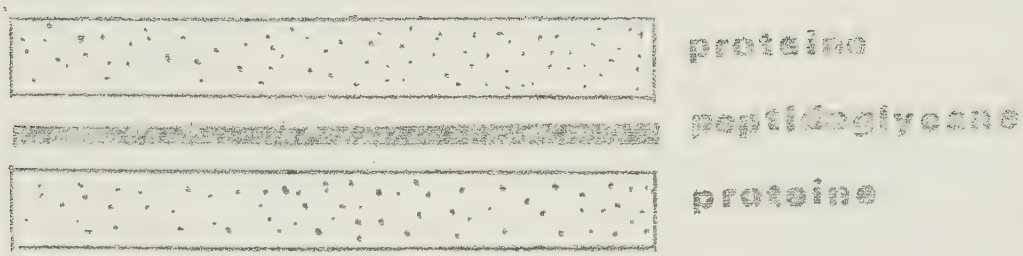


Figure 8

Schéma de la structure en triple couche de la paroi de B. subtilis cbl-1.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA PARTIE PROTEIQUE DE LA PAROI DE B. subtilis cbl-1

Comme nous venons de le voir, la paroi de B. subtilis cbl-1 est constituée par 75% de protéines. Ce fait remarquable nous a amenés à isoler et à purifier cette partie protéique, à montrer que nous avons affaire essentiellement à une seule protéine de haut poids moléculaire et à en étudier les propriétés.

A - Isolement de la partie protéique après autolyse des parois.

Les parois de B. subtilis s'autolysent rapidement (142, 134) phénomène pendant lequel il y a dégradation du peptidoglycane en petits fragments et solubilisation concomitante des autres polymères qui constituent la paroi (141). Les parois de B. subtilis cbl-1 s'autolysent également, mais avec une vitesse plus lente et dans des conditions optimales différentes (ce phénomène sera étudié plus en détail au chapitre V). Il y a aussi dégradation spécifique du peptidoglycane (cf. chapitre IV), mais nous avons voulu savoir s'il y avait simultanément solubilisation de la partie protéique. A la fin de l'autolyse de ces parois, nous avons centrifugé la suspension résiduelle et dialysé le surnageant. Nous avons ensuite déterminé les compositions en acides aminés et en hexosamines des différentes fractions : fraction insoluble, fraction non dialysable et dialysat (Tableau IV). La fraction insoluble renferme de faibles quantités de peptidoglycane et peu de protéines ; le peptidoglycane se partage entre le dialysat et la fraction non dialysable ; une faible quantité de peptides non spécifiques se retrouvent dans le dialysat : par contre, la fraction non dialysable est caractérisée par une très forte quantité de protéines et d'hexosamines (glucosamine et galactosamine). C'est sur cette fraction que nous avons poursuivi notre étude.

TABLEAU IV

Composés (nmoles/mg) parois	Parois avant autolyse	Parois après autolyse		
		fraction insoluble	fraction dialysable	fraction non dialysable
Asp	592	65	29	466
Thre	292	30	16	242
Ser	256	30	44	225
Glu	448	41	81	304
Gly	307	31	49	238
Ala	469	42	57	320
Val	230	-	-	-
Ile	103	13	4	57
Leu	263	31	9	165
Mur	99	0	16	59
DAP	97	2	20	69
Glc	223	3	20	176
Gal	117	8	2	106
Lys	292	31	17	201
His	27	36	1	19
Arg	92	9	3	42

Composition en acides aminés et en hexosamines de la paroi de *B. subtilis* cbl-1 et des différentes fractions obtenues après autolyse et dialyse contre du tampon acétate d'ammonium 0,02 M pH 7.

Après concentration, la fraction non dialysable a été filtrée sur un gel de SEPHADEX G-100 (cf. figure 9). 83% des protéines se retrouvent dans le pic principal qui est exclu du gel, tandis que les petits pics contiennent surtout des hexosamines et de faibles quantités de protéines. Le pic exclu du gel a été ensuite chromatographié sur DEAE-cellulose (cf. figure 10) afin de savoir s'il s'agit d'une seule ou de plusieurs protéines. Nous avons obtenu un pic principal A_1 et un pic secondaire B_1. Entre ces deux pics, le rapport des protéines est de 5:1.

B - Poids moléculaire*

Le poids moléculaire du pic A_1 a été déterminé par vitesse de sédimentation à l'équilibre, selon la technique de YPHANTIS (147). Par extrapolation de la courbe (cf. figure 11), nous obtenons un poids moléculaire de 255.600. A l'aide de cette méthode, nous avons obtenu un seul pic révélant que la protéine est homogène. Nous désignons celle-ci dans la suite du travail comme "protéine cbl-1".

C - Dosage des groupements sulfhydriles*

Les groupements sulfhydriles ont été dosés par réaction colorée selon ELLMAN (36) sur la protéine A_1. En milieu dénaturant, le dosage donne 17,5 µmoles/mg de protéine et en milieu non dénaturant il en donne 22,5 µmoles. Nous pouvons donc en conclure que cette protéine n'a pas de groupements sulfhydriles masqués. Ces valeurs correspondent environ à un groupement sulfhydrile pour 50.000 daltons.

---

* Nous remercions très vivement Monsieur G. BATELIER et Madame COSSON (Laboratoire d'enzymologie du CNRS, Gif-sur-Yvette) pour ces expériences.

FIGURE 9

FILTRATION SUR GEL SEPHADEX G-100 DE LA FRACTION NON DIALYSABLE DE L'AUTOLYSAT DES PAROIS DE B. subtilis cbl-1

La fraction non dialysable (51 mg protéine/100 mg paroi) concentrée à un volume de 3 ml par dialyse contre du glycérol puis contre du tampon phosphate 0,02 M pH 7 est ensuite déposée sur une colonne (100 x 2,5 cm) de gel SEPHADEX G-100. L'élution est réalisée avec du tampon phosphate de potassium 0,02 M pH 7. Le profil d'élution est obtenu en déterminant l'absorbance de chaque fraction (5 ml) à 220 nm. Les opérations sont effectuées à 4° C. Le pic principal exclu du gel renferme 42 mg de protéines.

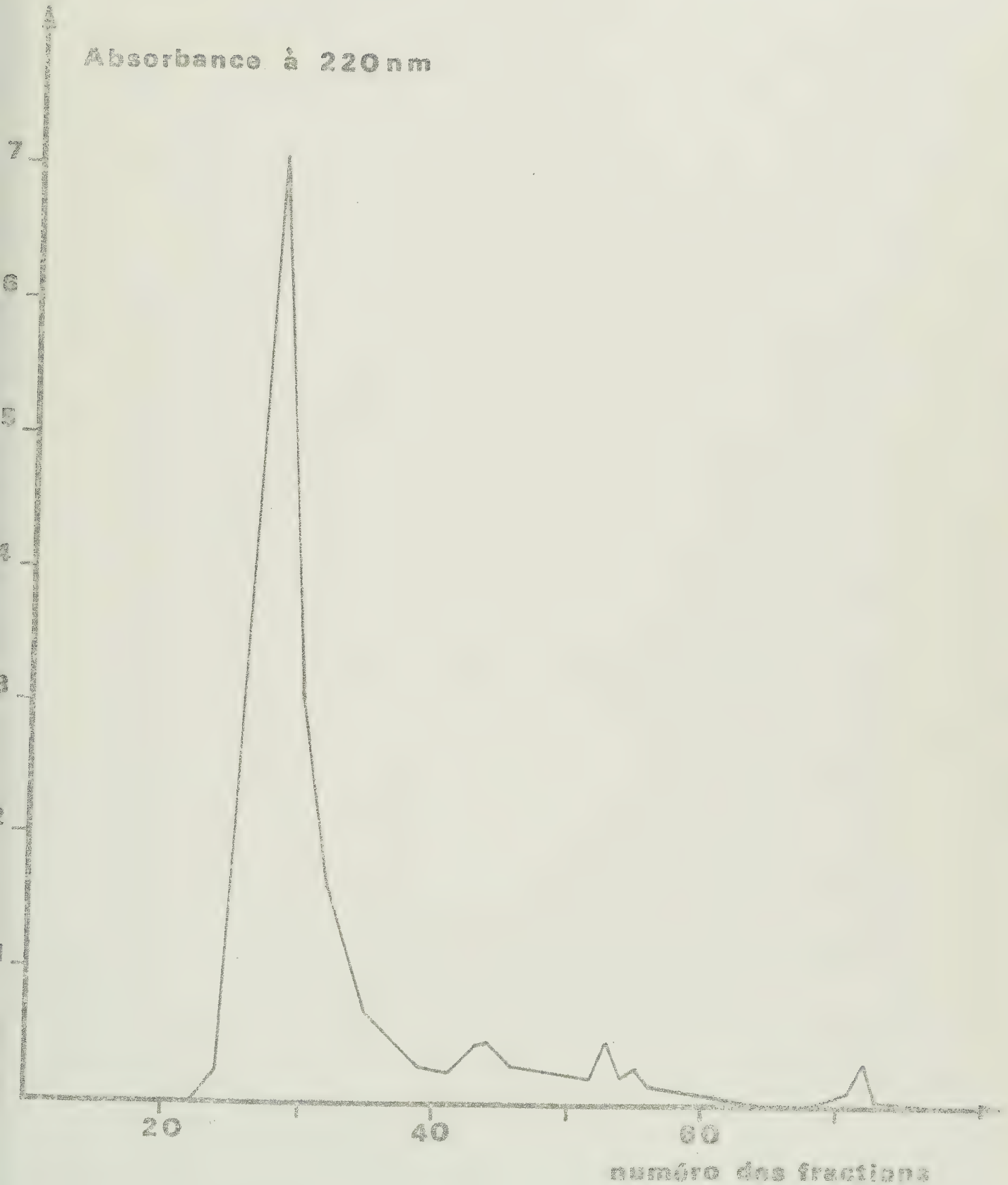
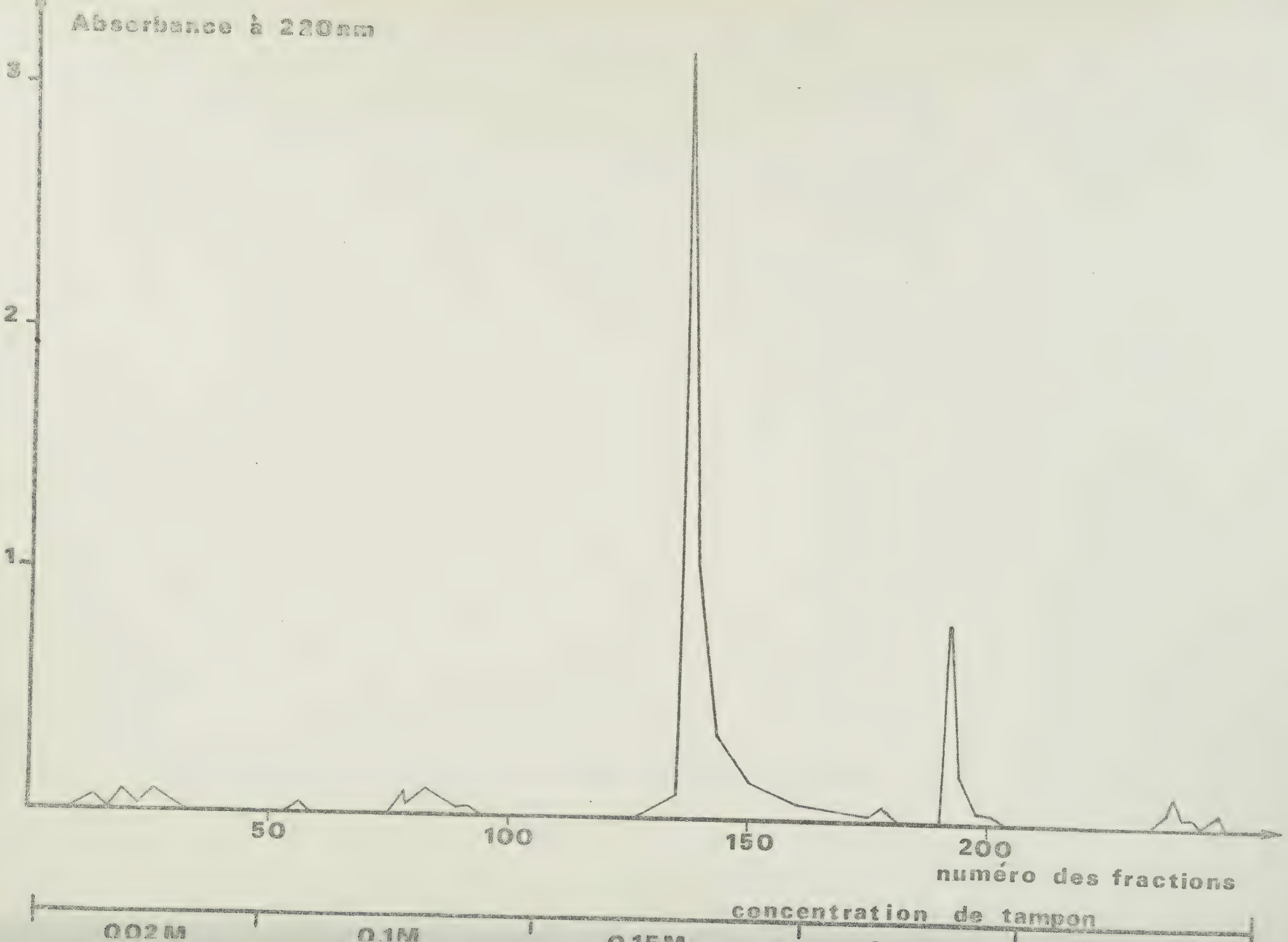

Absorbance à 220 nm
7
6
5
4
3
2
1
20
40
60
numéro des fractions

FIGURE 10

CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE DU PIC PRINCIPAL OBTENU PAR FILTRATION SUR GEL SEPHADEX G-100.

Après dialyse contre du tampon phosphate de potassium 0, 02 M pH 8, l'échantillon (fractions 22 à 34, figure 6) est déposé sur une colonne (40 x 2, 5 cm) de DEAE-cellulose, type Whatman DE-32, préalablement équilibrée avec du tampon phosphate de potassium 0, 02 M pH 8. L'élution est réalisée à 4° C par un gradient discontinu de phosphate de potassium avec un débit de 30 ml/heure. Le profil d'élution est obtenu par la détermination de l'absorbance de chaque fraction (4, 8 ml) à 220 nm.


Absorbance à 220nm
3
2
1
50
100
150
200
numéro des fractions
concentration de tampon
002M
0,1M
0,15M

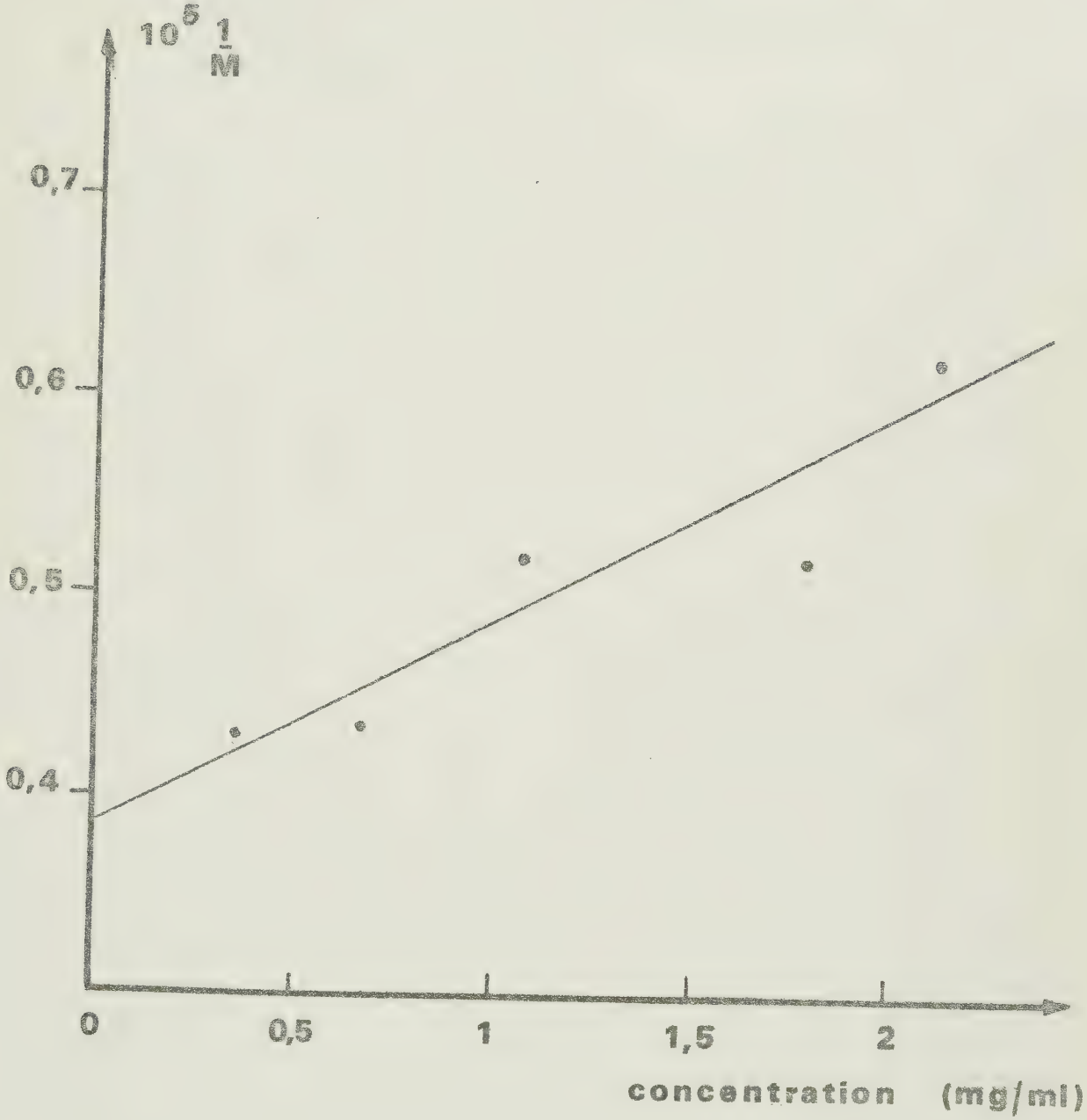


FIGURE 11

Dépendance de la concentration pour le poids moléculaire de la partie protéique de la paroi de B. subtilis cbl-1, par ultracentrifugation à l'équilibre dans le tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7 à 10° C. La sédimentation de la protéine est examinée dans la zone de concentration de 0,375 mg/ml à 2,25 mg/ml.

D - Solubilisation de la paroi par des agents chimiques

a) dodécylsulfate de sodium

Par traitement des parois de B. subtilis cbl-1 avec du dodécylsulfate de sodium à 2%, nous avons noté une diminution immédiate de 90% de la turbidité. Après centrifugation et dialyse, nous avons étudié la composition en acides aminés et en hexosamines du culot et du surnageant. Les résultats obtenus (cf. Tableau V) mettent en évidence que la partie protéique a été entièrement solubilisée tandis que le culot contient la totalité du peptidoglycane ainsi que toute la galactosamine et l'excès de glucosamine.

b) chlorure de guanidinium

Lorsque des suspensions de parois de B. subtilis cbl-1 sont traitées par des concentrations variables de chlorure de guanidinium, nous constatons une chute de la turbidité. La courbe de solubilisation (cf. figure 12) révèle l'existence d'un double phénomène : jusqu'à une concentration 2 molaire, il ne semble y avoir que solubilisation de la partie protéique, mais entre 4 et 6 M, il y a en plus solubilisation du peptidoglycane car la valeur de l'absorbance obtenue à 6 M indique que la paroi a été solubilisée à 98%. Si, par ailleurs, nous dialysons cette fraction 6 M contre de l'eau, un précipité se forme : le peptidoglycane se retrouve entièrement sous forme insoluble. Ces résultats montrent que le peptidoglycane peut être solubilisé sans rupture de liaisons covalentes et que des liaisons hydrogènes et peut-être électrostatiques contribuent de façon significative à la structure de cette macromolécule dans sa forme insoluble non dénaturée. Des expériences similaires ont été réalisées avec le peptidoglycane de E. coli K_{12} et ont donné les mêmes résultats. La solubilisation de ces peptidoglycanes est due sûrement à leur faible degré de réticulation et à leur faible épaisseur. Nous notons que c'est la première fois qu'un tel phénomène est observé.

TABLEAU V

Composés (nmoles/mg) parois	Parois non traitées	Parois traitées par le SDS 2%	
		Culot	Surnageant
Asp	592	16	500
Thre	292	8	233
Ser	256	12	220
Glu	448	112	274
Gly	307	7	238
Ala	469	146	300
Val	230	-	-
Ile	103	traces	102
Leu	263	3	174
Mur	99	96	1
DAP	97	96	3
Glc	223	159	26
Gal	117	68	26
Lys	292	-	275
His	27	-	27
Arg	92	-	60

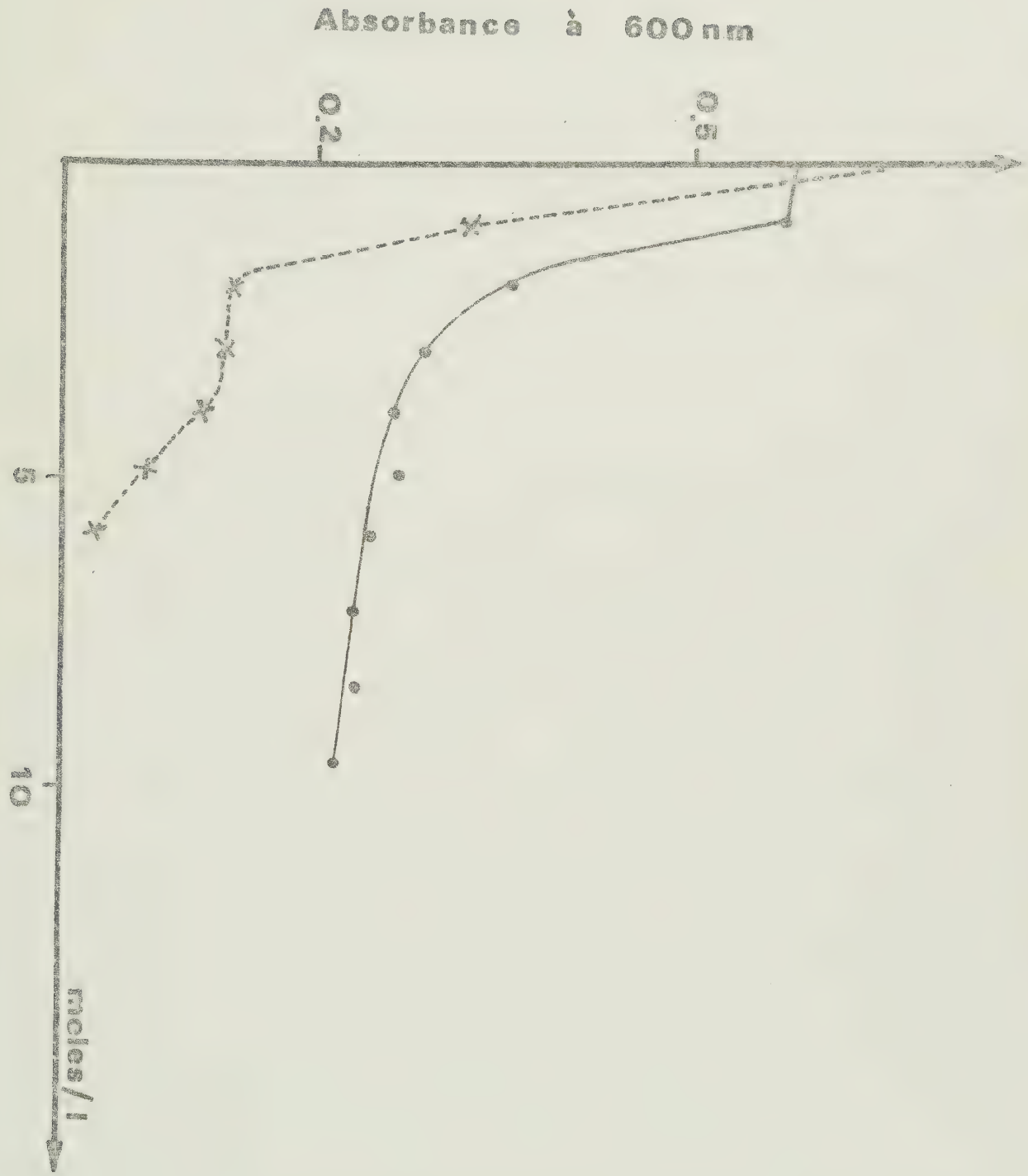
Action du dodécylsulfate de sodium 2% sur la paroi de B. subtilis cbl-1

Après action du dodécylsulfate de sodium 2% sur la paroi, la suspension résiduelle est centrifugée (20 minutes à 50.000 g). Le culot et le surnageant sont dialysés contre de l'eau puis soumis à une hydrolyse acide (HCl 6 N, 16 heures à 100° C) avant d'être analysés.

FIGURE 12

SOLUBILISATION DES PAROIS DE B. subtilis cbl-1 PAR LE CHLORURE DE LITHIUM OU LE CHLORURE DE GUANIDINIUM.

Les parois de B. subtilis cbl-1 sont mises en suspension (1 mg/ml) à 0° C dans des solutions de chlorure de lithium (o —— o) ou de chlorure de guanidinium (X ------ X) de concentrations variables. Immédiatement après mélange on lit l'absorbance à 600 nm.


Absorbance à 600 nm
0,2
0,5
5
10
mg/ml sec

c) l'urée

Les parois de B. subtilis cbl-1 sont mises en suspension dans des concentrations variables en urée. A faible concentration (2, 5 M ou 3, 5 M), la solubilisation n'est pas instantanée mais évolue avec le temps (cf. figure 13). A une concentration 8 M en urée, nous obtenons immédiatement 94% de solubilisation. L'action de l'urée sur cette paroi est différente de l'action du chlorure de guanidinium, en ce sens que le peptidoglycane et la partie protéique sont solubilisés en même temps.

d) chlorure de lithium

Lorsque des parois de B. subtilis cbl-1 sont mises en suspension dans des solutions de chlorure de lithium de concentrations variables, la turbidité diminue immédiatement (cf. figure 12). A forte concentration (9, 6 M), nous obtenons seulement 60% de solubilisation contrairement à ce que nous avons observé avec le dodécylsulfate de sodium ou le chlorure de guanidinium. Après traitement des parois par le chlorure de lithium 6 M, nous avons déterminé que la fraction soluble ne contient que des protéines, et la fraction insoluble renferme la totalité du peptidoglycane, toute la galactosamine et l'excès de glucosamine ainsi qu'une faible portion de la partie protéique (cf. Tableau VI). Ce traitement par chlorure de lithium a déjà été utilisé dans des études antérieures car il ne dénature pas la partie protéique comme le font les trois autres agents. SHOCKMAN et coll. (121) ainsi que FAN (33) se sont servis de ce sel pour extraire les enzymes autolytiques des parois de Streptococcus faecalis et B. subtilis.

E - Isolement de la partie protéique après action du chlorure de lithium 6 M sur la paroi de B. subtilis cbl-1.

La fraction soluble obtenue après action du chlorure de lithium 6 M (Tableau VI) a tout d'abord été filtrée sur un gel de SEPHADEX

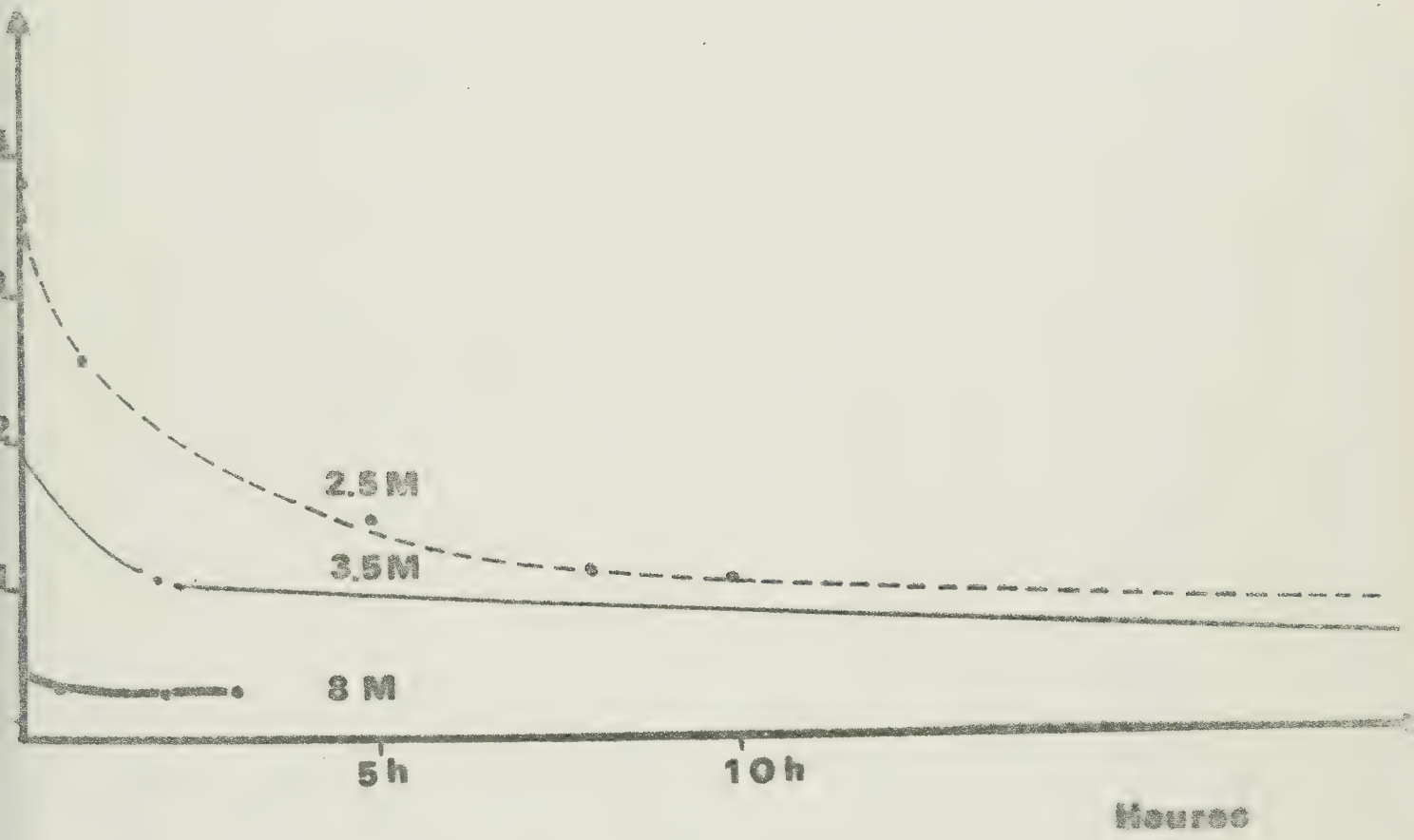


FIGURE 13

EVOLUTION DE LA SOLUBILISATION DES PAROIS PAR L'UREE EN FONCTION DU TEMPS

Les parois sont mises en suspension (1 mg/ml) dans des concentrations variables d'urée, à température ambiante. Immédiatement après mélange, l'absorbance est lue à 600 nm au cours du temps.

TABLEAU VI

Composés (nmoles/mg) parois	Parois non traitées	Parois traitées par LiCl	
		Fraction insoluble	Fraction non dialysable
Asp	592	98	352
Thre	292	39	219
Ser	256	51	190
Glu	448	164	232
Gly	307	60	221
Ala	469	202	222
Val	230	-	-
Ile	103	5	81
Leu	263	40	170
Mur	99	98	0
DAP	97	98	0
Glc	223	198	0
Gal	117	98	0
Lys	292	-	-
His	27	-	-
Arg	92	-	-

Composition chimique des fractions solubles et insolubles obtenues après traitement de la paroi du chlorure de lithium 6M. Les parois de B. subtilis cbl-1 sont mises en suspension dans du chlorure de lithium 6 M à 4° C.

G-100 (cf. figure 14). Le profil d'élution obtenu donne un seul pic de protéines, exclu du gel. Ce pic a été ensuite chromatographié sur DEAE-cellulose et nous avons obtenu un pic principal (cf. figure 15) A_2 et un pic secondaire B_2. Nous remarquons que les profils d'élution pour ces deux chromatographies (SEPHADEX G-100 et DEAE-cellulose) sont similaires à ceux obtenus lors de la purification de la fraction non dialysable de l'autolysat (cf. figures 9 et 10) exceptés que les hexosamines sont absentes car elles sont restées dans la fraction insoluble, lors du traitement par le chlorure de lithium.

F-Analyse de la partie protéique par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

a) Partie protéique isolée par autolyse

Le pic A_1 a été examiné par électrophorèse sur gel de polyacrylamide sans dénaturation préalable, par la technique de WEBER et OSBORN (135). Nous avons obtenu une bande fine (figure 16) de faible mobilité qui représente 90% des protéines colorées du gel, ce qui dénote bien la présence d'une protéine dominante, la protéine cbl-1. Ce résultat confirme ce que nous avons obtenu par la technique d'ultracentrifugation à l'équilibre. Afin de mieux connaître cette protéine, nous l'avons dénaturée par du dodécylsulfate de sodium à 2% et analysée par des électrophorèses sur gel de polyacrylamide selon la technique de WEBER et coll. (135), en présence et en absence de 2-mercaptoéthanol. Sur le gel, nous avons obtenu deux bandes (cf. figure 17). En employant la β-galactosidase (135.000 daltons) et la phosphorylase b (94.000 daltons) comme références, nous avons pu estimer le poids moléculaire de ces deux bandes à : 155.000 et 105.000 daltons. Dans la suite de cette étude, nous désignerons ces deux bandes par α (155.000) et β (105.000). Ces résultats confirment la valeur élevée du poids moléculaire de la protéine cbl-1, déterminée par ultracentrifugation et montrent que les deux chaînes α et β sont

FIGURE 14

FILTRATION SUR GEL SEPHADEX G-100 DU SURNAGEANT DES PAROIS TRAITEES PAR DU CHLORURE DE LITHIUM 6 M.

36 ml d'une suspension de paroi de B. subtilis cbl-1 (c = 2 mg/ml) sont traitées par 36 ml de chlorure de lithium 12 M. Après centrifugation, le surnageant dialysé contre du tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 8 puis concentré à un volume de 5 ml par dialyse contre du glycérol, est déposé sur une colonne (100 x 2,5 cm) de gel de SEPHADEX G-100. L'élution est réalisée par du tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 8. L'absorbance de chaque fraction est déterminée à 220 nm. Toutes ces opérations ont été effectuées à 4° C.

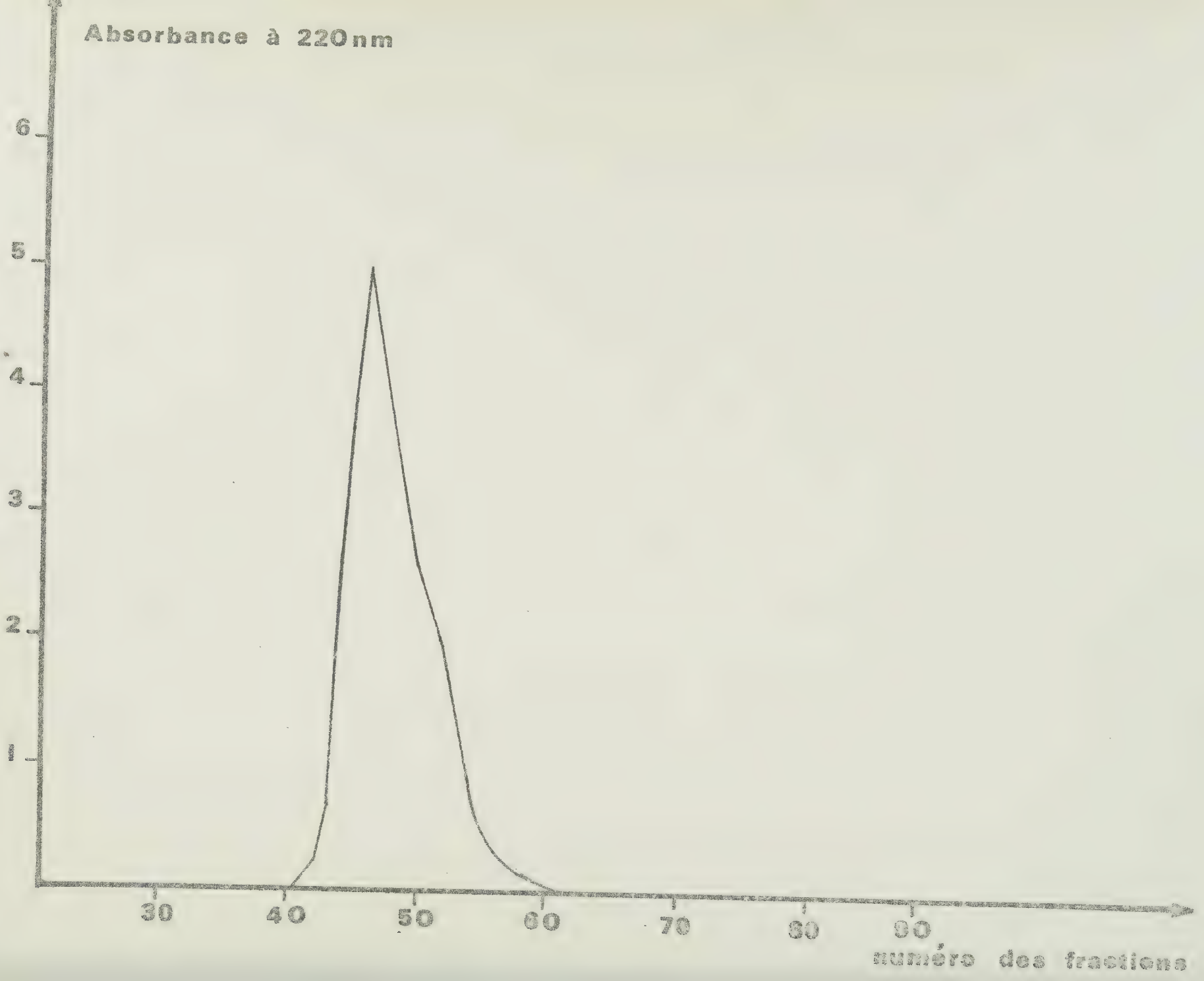

Absorbance à 220nm
6
5
4
3
2
1
30
40
50
60
70
80
90
numéro des fractions

FIGURE 15

CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE DU PIC OBTENU PAR FILTRATION SUR GEL SEPHADEX G-100.

Après dialyse contre du tampon phosphate de potassium 0,02 M pH 8, l'échantillon (fractions 40 à 50 de la figure 11) est déposé sur une colonne (40 x 2,5 cm) de DEAE-cellulose préalablement équilibrée avec du tampon phosphate de potassium 0,02 M pH.8. L'élution est réalisée comme pour le surnageant d'autolyse (cf. figure 7) avec un débit de 30 ml/heure. Les protéines dans les pics A_2 et B_2 sont dans le rapport 5 : 1.

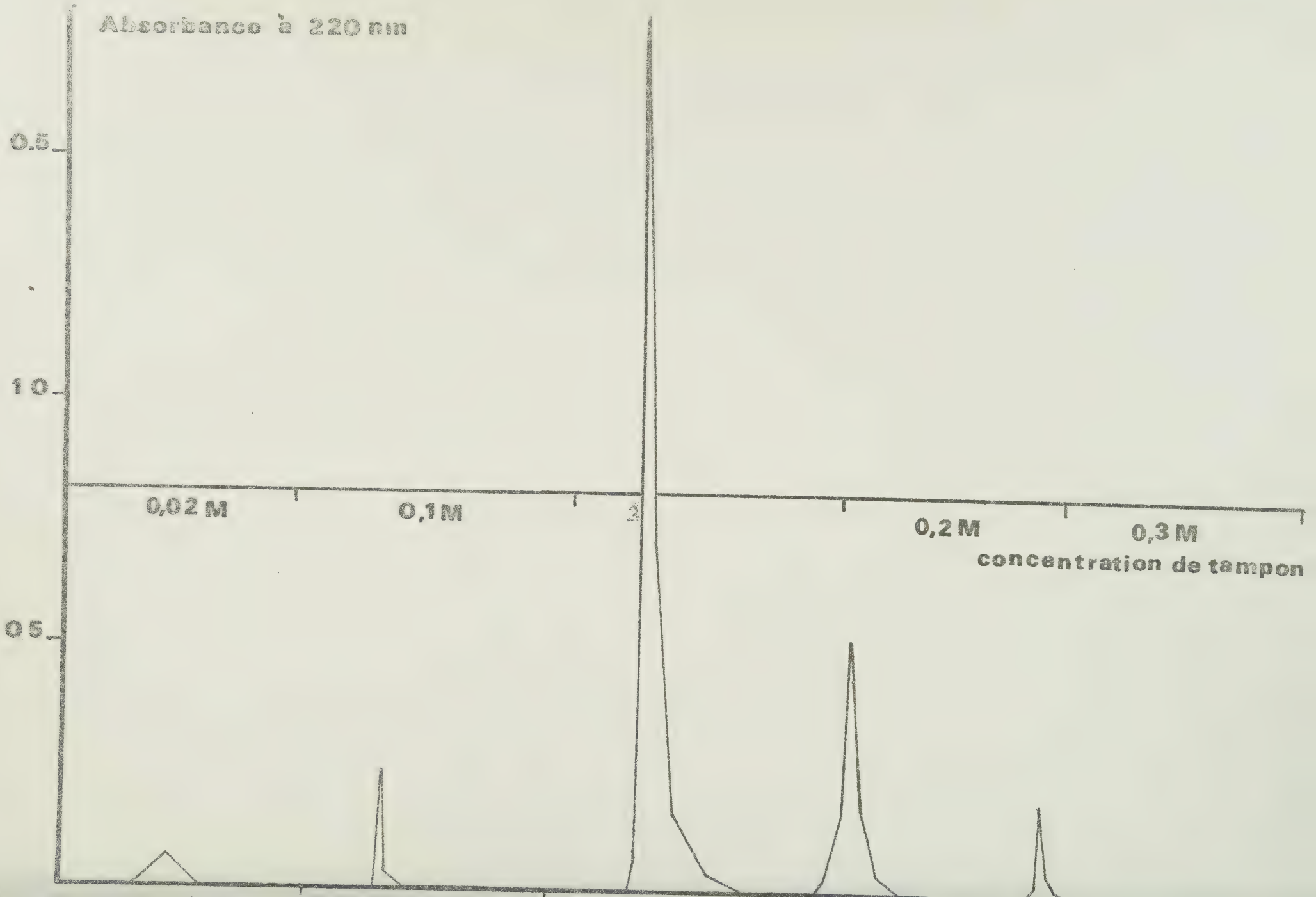

Absorbance à 220 nm
0.5
1 0
0 5
0,02 M
0,1 M
0,2 M
0,3 M
concentration de tampon

FIGURE 16

ELECTROPHEROGRAMME DE LA PROTEINE NATIVE DE LA PAROI DE B. subtilis cbl-1.

L'électrophorèse est réalisée avec 25 µg de protéines sur un gel à 5% en polyacrylamide dans le tampon phosphate de sodium 0,01 M pH 7. La migration du gel se fait de la gauche vers la droite.

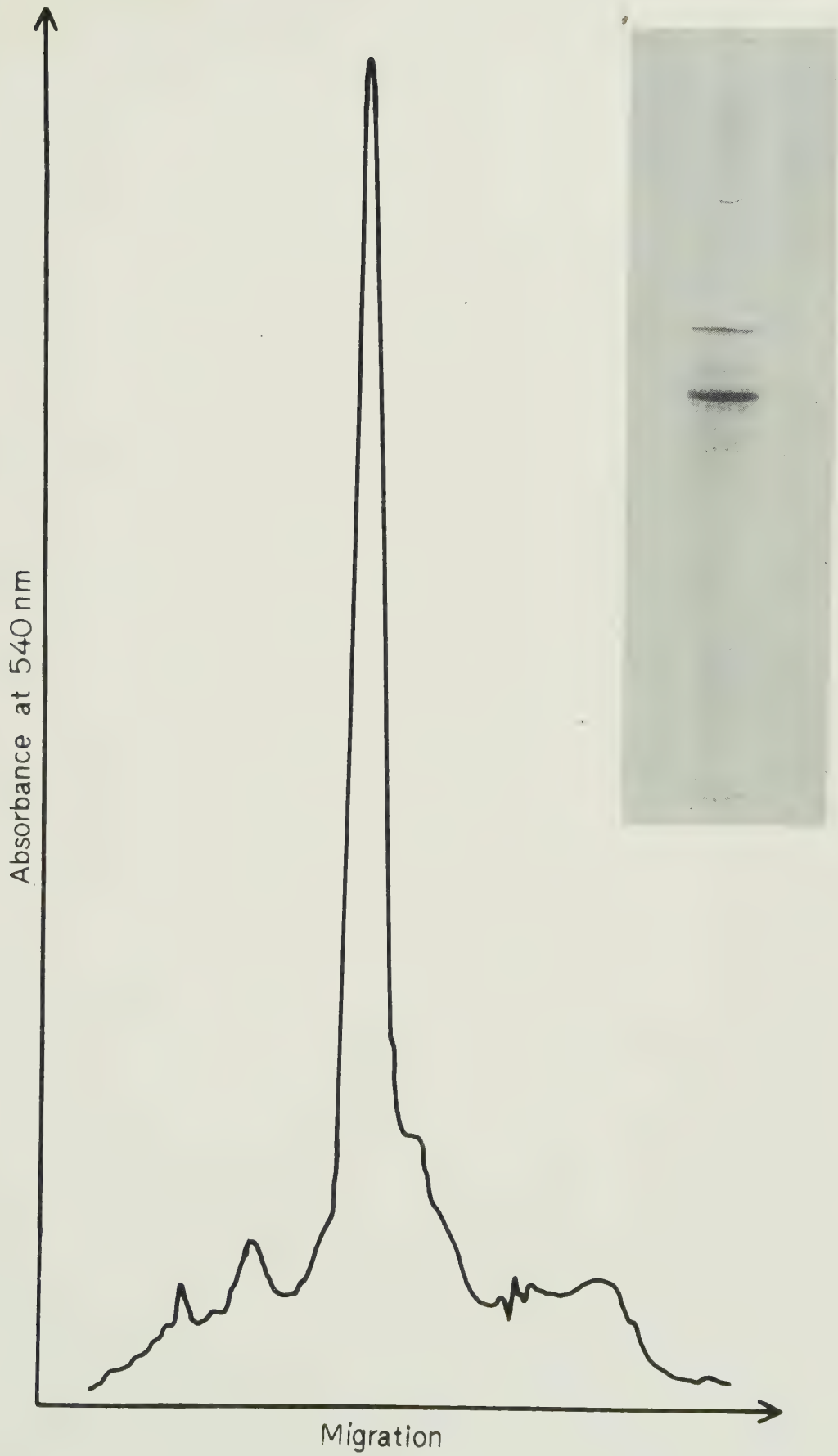
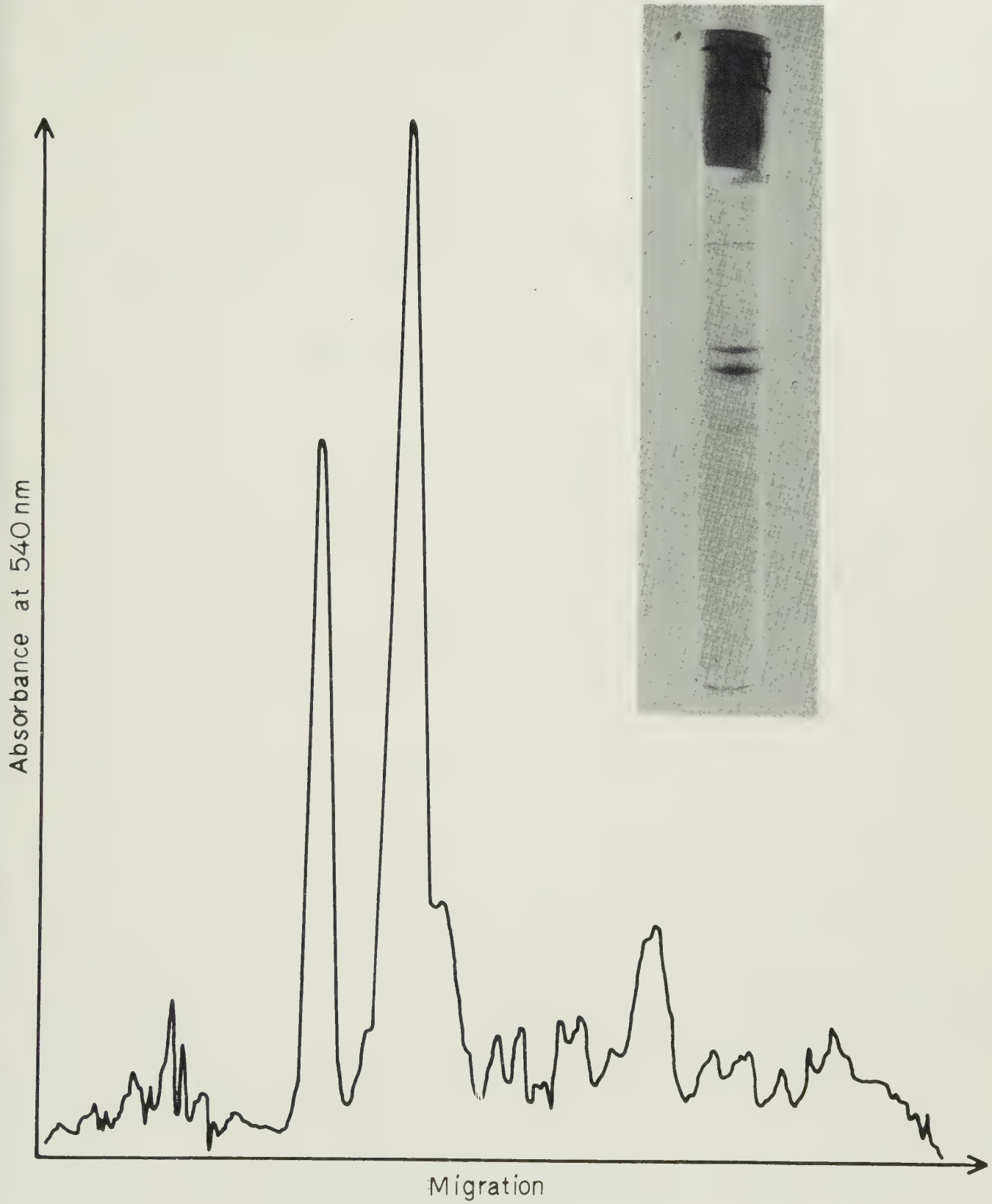

Absorbance at 540 nm
Migration

FIGURE 17

ELECTROPHEROGRAMME DE LA PROTEINE DE LA PAROI DE *B. subtilis* cbl-1.

L'électrophorèse est réalisée avec 25 µg de protéine sur un gel à 5% de polyacrylamide dans le tampon phosphate de sodium 0,01 M pH 7. La protéine est préalablement traitée par du dodécylsulfate de sodium 1 % et du 2-mercaptoéthanol 1 % , deux minutes à 100° C. La migration du gel se fait de la gauche vers la droite.


Absorbance at 540 nm
Migration

liées de façon non covalente et que dans leur mode de liaison aucun groupement sulfhydrile n'intervient puisque avec et sans 2-mercaptoéthanol nous avons obtenu pour ces chaînes peptidiques, la même migration ainsi que la même intensité de coloration.

b) Partie protéique isolée avec le chlorure de lithium 6 M

Afin de confirmer l'identité des protéines obtenues par autolyse d'une part et par action de chlorure de lithium 6 M sur la paroi d'autre part, nous avons réalisé des électrophorèses sur gels de polyacrylamide des pics A_1 et A_2 obtenus après chromatographie sur DEAE-cellulose. Ces électrophorèses ont été faites avec et sans dodécylsulfate de sodium à 2% et dans les deux cas sans 2-mercaptoéthanol. Les électrophérogrammes sont exactement les mêmes pour les pics A_1 et A_2 (cf. figure 19).

c) Partie protéique solubilisée par l'urée

Les parois traitées par de l'urée 8 M ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 4% en urée 8 M (60), et nous avons alors observé deux bandes principales ainsi qu'une série de trois à quatre bandes de faible intensité. La protéine A_1, isolée après autolyse, a été traitée dans les mêmes conditions et par électrophorèse donne deux bandes (cf. figure 20) qui correspondent aux sous-unités α et β obtenues par autolyse ainsi que par action du chlorure de lithium 6 M sur la paroi.

d) Comparaison de la partie protéique isolée par différents traitements, avec la paroi entière.

Si nous analysons par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon la technique de WEBER et coll. (135), les parois de B. subtilis cbl-1 traitées par du dodécylsulfate de sodium à 2%, nous remarquons

FIGURE 18

ELECTROPHEROGRAMMES DE DIFFERENTS ECHANTILLONS TRAITES AVEC DU DODECYLSULFATE DE SODIUM 1% ET DU 2-MERCAPTOETHANOL 1%.

Les électrophorèses ont été réalisées avec des échantillons contenant 30 à 40 µg de protéine et les différents gels représentent successivement : (A) préparation A_1 ; (B) paroi cbl-1 ; (C) préparation B_1 ; (D) fraction insoluble de l'autolysat. La migration des gels se fait de la gauche vers la droite.

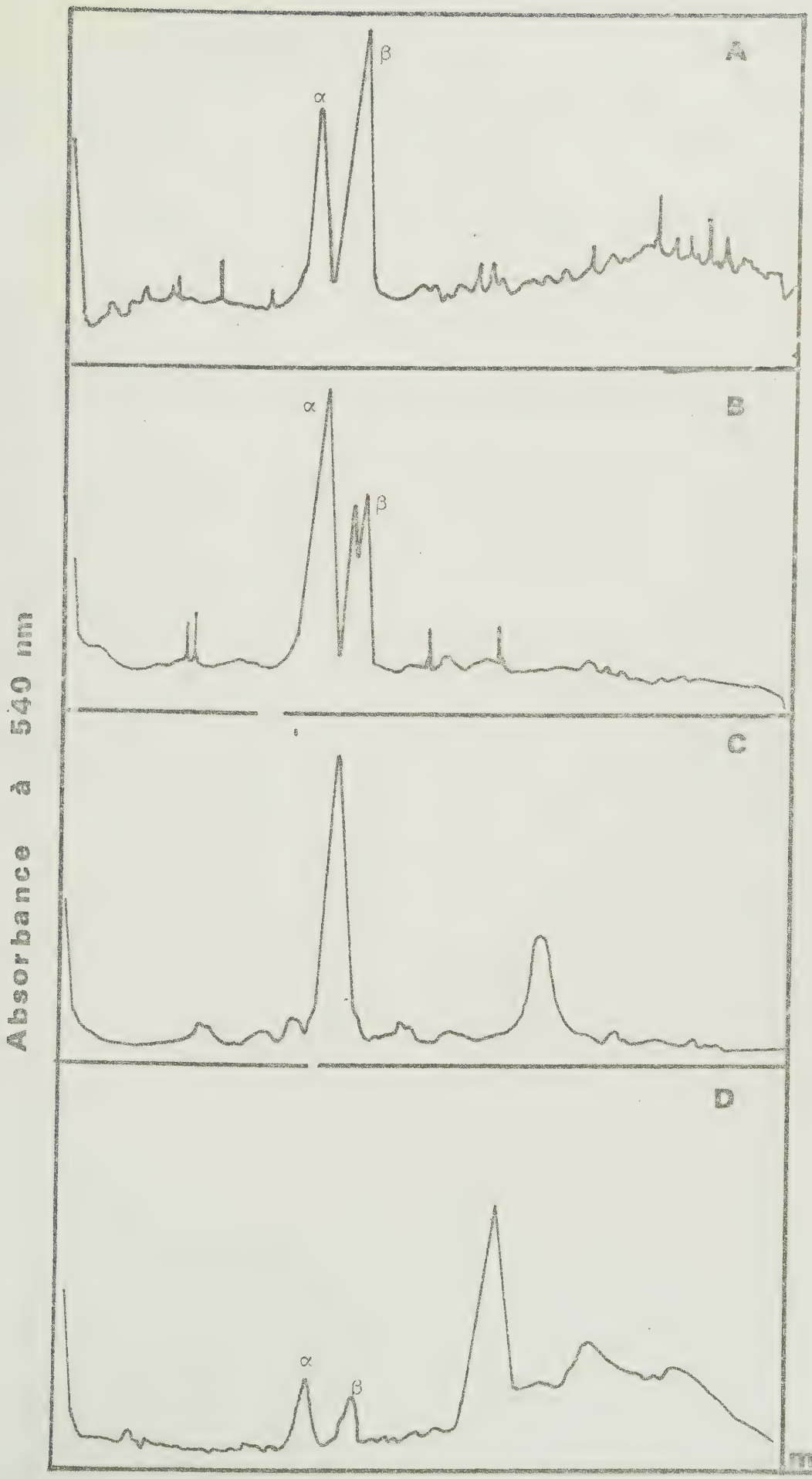
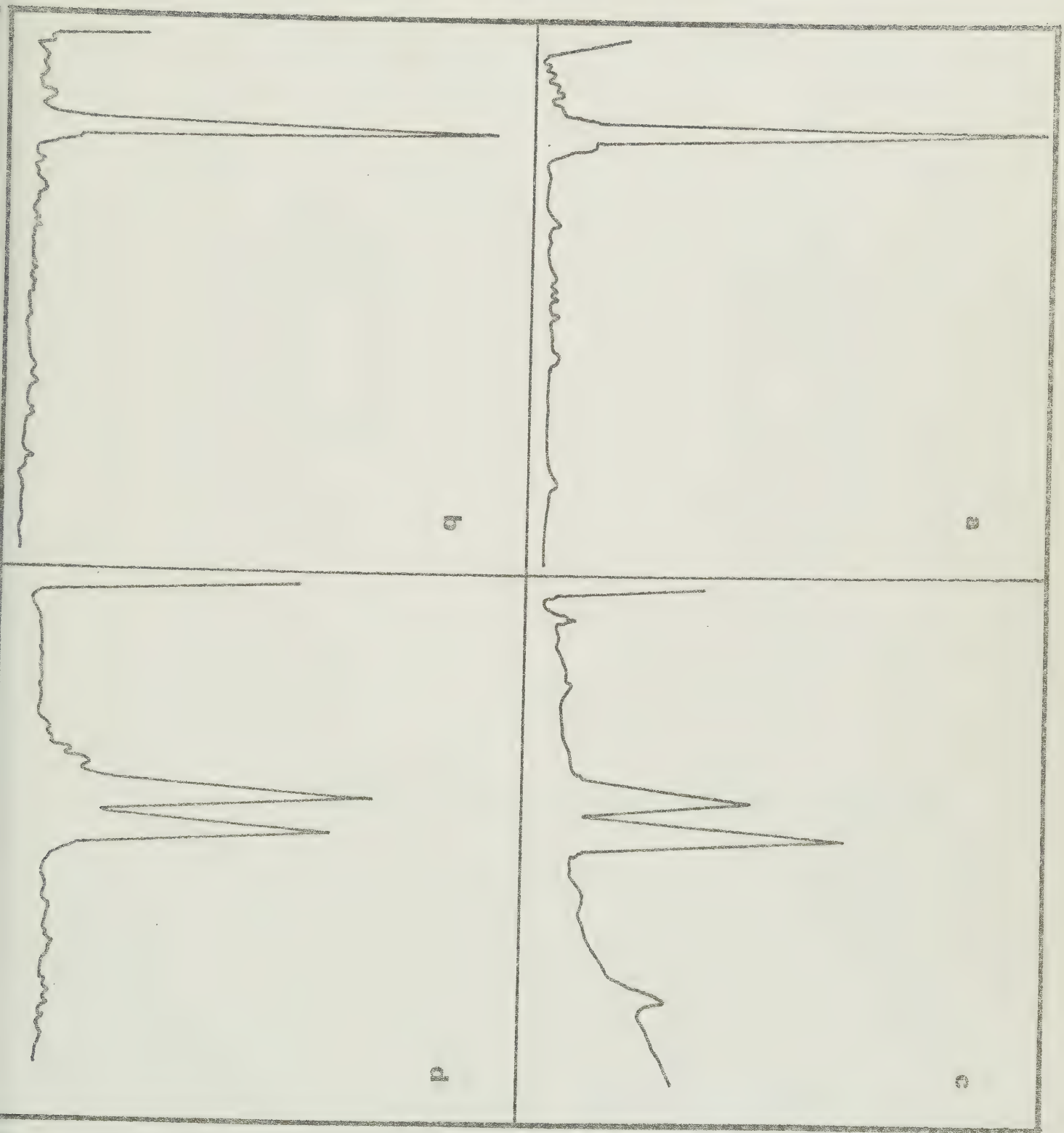

A
α
β
B
α
β
C
D
α
β
Absorbance à 540 nm
migration

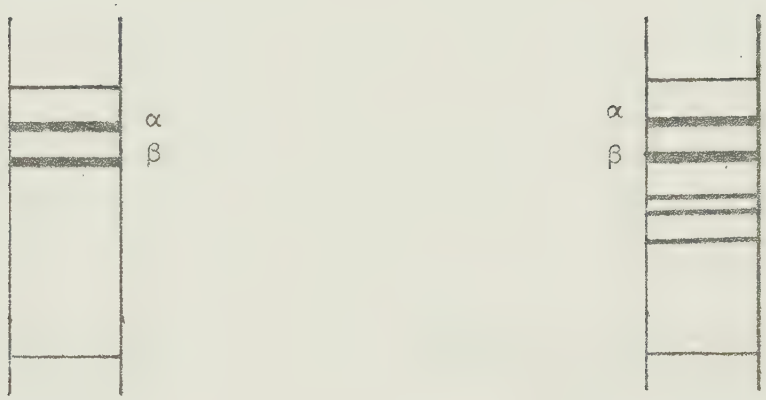
FIGURE 19

ELECTROPHEROGRAMMES DE LA PROTEINE PURIFIEE DE LA PAROI DE B. subtilis cbl-1.

Les électrophorèses sont réalisées avec 30 ou 40 µg de protéine sur des gels à 5% de polyacrylamide, avec dodécylsulfate de sodium 1% (C) et (D), et sans dodécylsulfate de sodium 1% (A) et (B). Pour (A) et (B), il s'agit des protéines A_1 et A_2 respectivement non traitées. Pour (C) et (D), il s'agit des protéines A_1 et A_2 respectivement traitées par du dodécylsulfate de sodium 1% à 100° C pendant 2 minutes. La migration du gel se fait de la gauche vers la droite.

Absorbance à 540nm





F I G U R E 20

ELECTROPHORESES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN UREE 8 M

(1) protéine A_1 après DEAE-cellulose ; (2) paroi de B. subtilis cbl-1 traitée par l'urée 8 M.

que les chaînes α et β représentent la majeure partie du matériel protéique de la paroi (figure 18 B). Quand nous examinons la fraction insoluble restant après autolyse, les deux bandes α et β sont encore présentes mais ne sont plus du tout prédominantes (cf. figure 18 D). Nous trouvons à la place une bande importante, de poids moléculaire plus faible, ainsi qu'un large épaulement qui doit contenir des chaînes peptidiques de faibles poids moléculaires. Ces résultats montrent qu'une activité protéolytique est associée avec les parois de B. subtilis cbl-1 et est responsable de la dégradation partielle de la protéine cbl-1 pendant l'autolyse.

Si nous comparons les électrophérogrammes des protéines A_1 et A_2 (cf. figures 19C et 19 D) avec celui de la paroi entière (cf. figure 18 B), nous remarquons une perte dans la quantité de la chaîne α par rapport à la chaîne β, ce qui est sûrement dû à la présence, dans ces préparations, d'activité protéolytique qui dégrade plus spécifiquement la sous-unité α. D'autre part, nous avons constaté que la quantité de chaînes peptidiques de faibles poids moléculaires semble augmenter après décongélations répétées des échantillons conservés à -20° C.

La fraction protéique correspondant au pic B_1 obtenu après chromatographie sur DEAE-cellulose (cf. figure 10) donne essentiellement une bande par électrophorèse avec du dodécylsulfate de sodium en présence ou en absence de 2-mercaptoéthanol (cf. figure 18 C). Cette protéine a un poids moléculaire légèrement plus élevé que celui de la sous-unité β et elle est présente dans les parois de B. subtilis cbl-1 (cf. figure 18 B). Etant en quantité cinq fois plus faible que la protéine cbl-1, son étude n'a pas été poursuivie pour le moment.

G - Electrofocalisation

L'électrofocalisation est une méthode qui permet de purifier les protéines selon leurs points isoélectriques. Nous avons soumis à cette technique la protéine A_1 isolée après autolyse et avons obtenu un

diagramme d'élution (cf. figure 21) comprenant deux pics que nous avons désignés par A_1F et A_1F'. Le pic A_1F est nettement plus important que le pic A_1F' et présente un point isoélectrique à pH 4,2. La présence de ces deux pics et leur différence de grandeur démontrent à nouveau le phénomène de protéolyse observé lors des analyses par électrophorèses sur gel de polyacrylamide. L'effet de cette protéolyse est de modifier le point isoélectrique de cette protéine puisque A_1F' a un pH de 4 et non de 4,2.

H -Etude immunochimique de la protéine A_1

Nous avons essayé de savoir si cette protéine était présente dans la souche de référence B. subtilis 168 wt. Ni avec la paroi, ni avec l'extrait bactérien, nous n'avons obtenu de ligne de précipitation contre le sérum anti-protéine (Ra-A_1) ou contre le sérum anti-paroi cbl-1. Si on utilise des extraits bactériens contenant environ 300 fois la quantité nécessaire pour obtenir une ligne de précipitation, nous n'obtenons aucune réaction

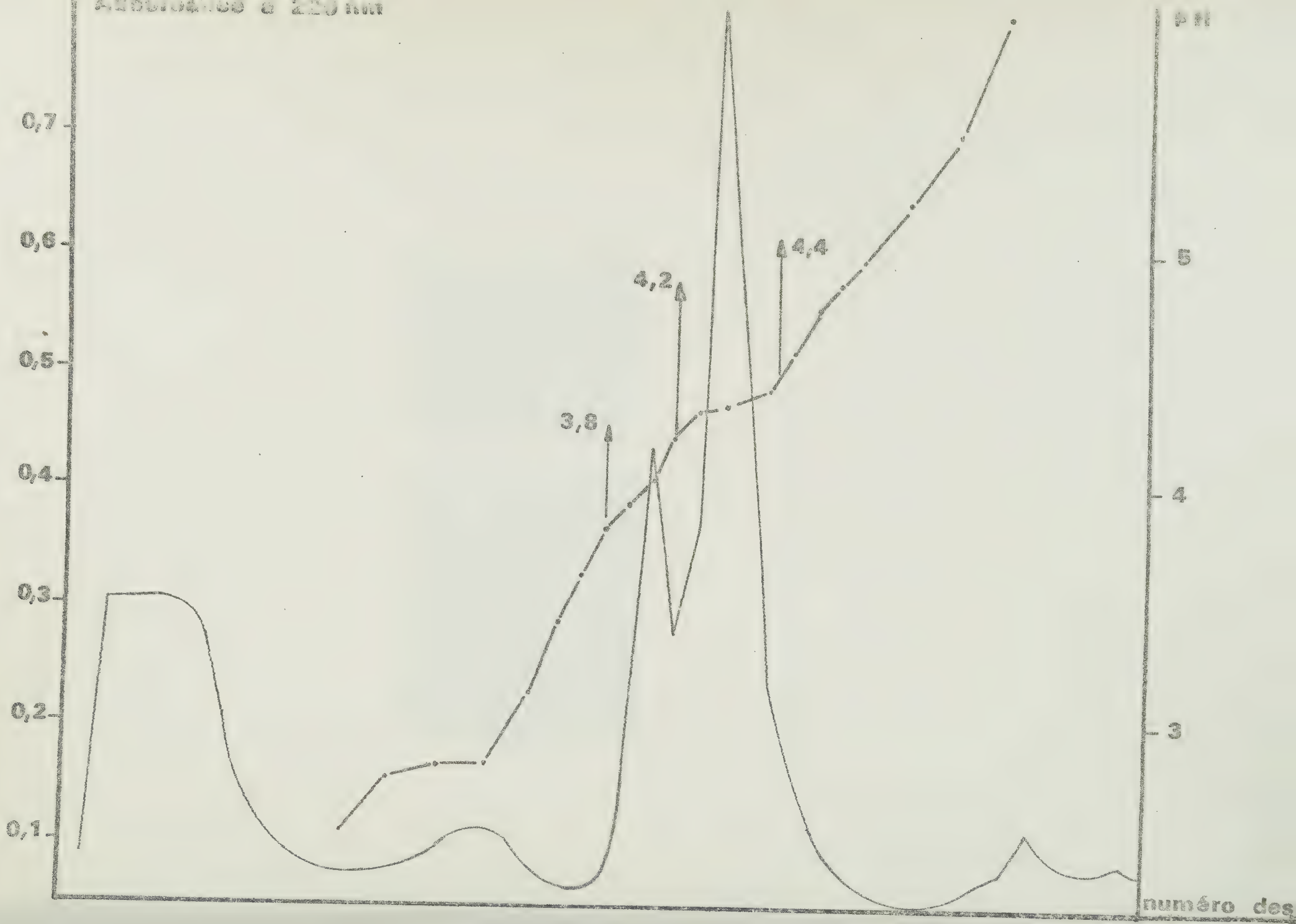
Etant donné que nous avons observé par électrofocalisation ainsi que par électrophorèse sur gel de polyacrylamide une certaine hétérogénéité de la protéine due à une protéolyse, nous avons voulu vérifier s'il existait des différences dans les propriétés antigéniques des différentes préparations. Nous avons alors entrepris des études immunochimiques avec la protéine A_1 isolée par autolyse, la protéine A_2 obtenue par action du chlorure de lithium 6 M sur la paroi ainsi qu'avec la paroi entière. Avec le sérum anti-protéine (Ra-A_1) ou avec le sérum anti-paroi cbl-1, nous avons obtenu deux lignes de précipitation que ce soit avec les protéines A_1 et A_2 ou que ce soit avec les parois entières de B. subtilis cbl-1 (cf. figure 22). Les deux lignes formées par les parois de B. subtilis cbl-1 rejoignent la ligne du composant le moins

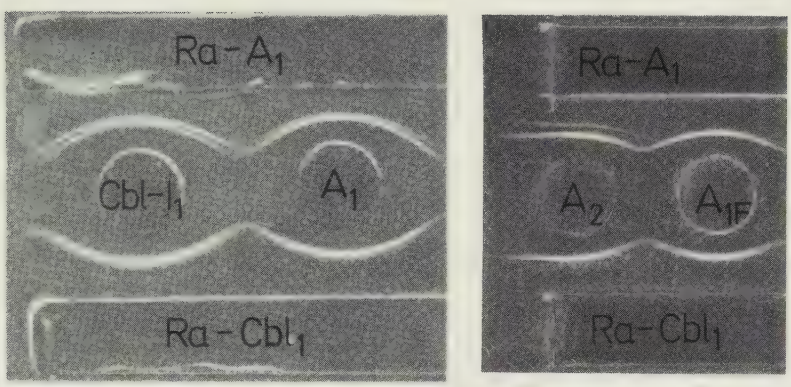
FIGURE 21

ELECTROFOCALISATION DU PIC A_1 ISOLE PAR AUTOLYSE DES PAROIS DE B. subtilis cbl-1.

(————) : absorbance à 220 nm ;

(—· —· —·) : pH


Absorbance à 280 nm
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
3,8
4,2
4,4
pH
5
4
3
numéro des



F I G U R E 22

IMMUNOELECTROPHORESES DE LA PROTEINE cbl-1

Des doubles précipitations par immunodiffusion sont obtenues avec les préparations de protéine A_1, A_2, A_1F et les parois de B. subtilis cbl-1, contre les sérums Ra-A_1 (anti-protéine A_1) ou Ra-cbl-1 (anti-paroi cbl-1).

diffusible formé par la protéine A_1. Ces résultats suggèrent que le composant le plus diffusible (cf. figure 22) est un produit de dégradation, obtenu peut-être par protéolyse. Ceci confirme ce que nous avons observé lors des analyses par gels d'électrophorèse en présence de dodécylsulfate de sodium des protéines A_1 et A_2. Par ailleurs, les fractions A_1F et A_1F' obtenues par électrofocalisation de la protéine A_1 sont antigéniquement homogènes contre le sérum anti-protéine cbl- ainsi que contre le sérum anti-paroi cbl-1. La bande la plus diffusible a disparu, ce qui suggère que les deux protéines purifiées par électrofocalisation correspondent à la même protéine. La coupure qui s'est opérée par protéolyse n'a en fait pas modifié l'antigénicité mais a seulement modifié légèrement le comportement électrophorétique. Le composant le plus diffusible n'est plus détectable après électrofocalisation, ayant sans doute été éliminé.

I - Bilan des constituants de la paroi de B. subtilis cbl-1.

Afin de connaitre ce que représente, en poids, la partie protéique de la paroi par rapport à l'ensemble des protéines de la cellule, nous avons, après cassage des bactéries et centrifugation, dosé les protéines dans la paroi (75 µg/mg poids sec bactéries) ainsi que dans l'extrait bactérien (500 µg/mg poids sec bactéries). Nous avons trouvé que la protéine de la paroi représente 13% des protéines totales de la cellule. En comparant les poids secs de paroi et de bactéries, nous avons déterminé que la paroi représente 9,7% de la bactérie. L'ensemble de ces résultats (dosage de protéines et poids sec) sont groupés dans le Tableau VII. Nous remarquons que la partie protéique représente 75% en poids de cette paroi et que nous retrouvons le résultat établi au chapitre II. Les protéines de l'extrait bactérien représentent la moitié du poids de la bactérie.

En admettant que la protéine cbl-1 représente 80% des protéines de la paroi (20% des protéines dosées dans la paroi étant dues à la protéine du pic B_1) et compte tenu qu'il y a 75% de protéines dans

TABLEAU VII

Paroi	Protéine de la paroi	Protéines cellulaires
9,7%	7,5%	50%

Poids sec de paroi et dosage de protéine (rapporté au poids sec de bactérie) dans la paroi et dans l'extrait bactérien.

TABLEAU VIII

Constituants	% poids sec
Protéine	75
Peptidoglycane	9
Polymère hexosamine	5
Lipides	3-4

Bilan des composés de la paroi de B. subtilis Cbl-1

Le calcul pour le peptidoglycane ainsi que pour les polymères d'hexosamines a été établi d'après l'analyse en acides aminés et hexosamines des parois non traitées, et en ayant tenu compte des molécules d'eau.

cette paroi, nous pouvons dire que la protéine cbl-1 représente 62,5% de la paroi. Sa purification a été effectuée avec un rendement de 80%. D'autre part, à l'aide de son poids moléculaire et d'un comptage de cellules rapporté au poids sec, nous avons pu déterminer qu'il y avait environ 200.000 molécules de protéines cbl-1 par bactérie.

Par ailleurs, nous avons pu établir un bilan des différents constituants qui composent la paroi (cf. Tableau VIII) à l'aide de ces résultats et de ceux donnés dans le chapître II. En faisant la somme, nous trouvons 93% du poids de la paroi, ce qui est un bilan acceptable étant donné la complexité des macromolécules qui entrent en jeu.

J - Mode d'association de la protéine cbl-1 avec les autres constituants de la paroi.

L'action du dodécylsulfate de sodium, du chlorure de guanidinium, de l'urée et celle du chlorure de lithium sur la paroi de B. subtilis cbl-1 a permis de séparer la protéine cbl-1 des autres polymères pariétaux. De ces études, il ressort que la protéine cbl-1 est le constituant majeur des deux couches entourant le peptidoglycane, observées au microscope électronique (cf. figures 4a et 4b) et que les molécules de protéines dans chacune des deux couches sont associées entre elles par un mode de liaison non covalent. D'autre part, ces résultats montrent aussi que les deux couches de protéines et le peptidoglycane ne sont pas liés covalentiellement.

K - Mise en évidence de la protéine cbl-1 au cours des différents stades du cycle de vie de la bactérie.

Des cultures de B. subtilis cbl-1 ont été arrêtées en phase exponentielle, en phase stationnaire et à la phase de spores. Les spores ont été obtenues par la méthode décrite par KERJAN et SZULMAJSTER (79). Par microscopie électronique, nous avons vérifié que l'hydrolyse

des sporanges par le lysozyme avait été complète. Les bactéries entières et des spores ont été traitées selon la méthode de BRAGG et HOU (11) et analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (cf. figure 23). Les résultats obtenus montrent l'existence de deux bandes α et β de la protéine cbl-1 tout au cours de la croissance bactérienne et même dans les spores. Nous avons utilisé comme référence, une électrophorèse de la protéine purifiée par chromatographie sur DEAE-cellulose. Des immunodiffusions des spores contre le sérum anti-protéine cbl-1 et contre le sérum anti-paroi cbl-1, nous ont montré que les deux lignes de précipitation obtenues étaient identiques à celles trouvées (cf. figure 22) pour la protéine cbl-1. Par ailleurs, des immunodiffusions contre les sérums anti-protéine cbl-1 et anti-paroi cbl-1 des spores de B. subtilis 168 wt n'ont donné aucune ligne de précipitation.

Résumé

La paroi de B. subtilis cbl-1 comporte 75% de protéines constituées par une protéine unique, de poids moléculaire élevé (255.000 daltons). Cette protéine forme deux couches localisées dans l'espace périplasmique et à la face externe du peptidoglycane. Elle est composée de deux sous-unités α et β qui ont respectivement un poids moléculaire de 155.000 et 105.000 daltons. Un mode de liaison non covalent associe ces sous-unités, maintient la cohésion des molécules de protéines cbl-1 dans chacune des deux couches et lie cette protéine aux autres constituants de la paroi (peptidoglycane et polymère de galactosamine). La protéine cbl-1 existe au cours des différents stades de vie de la bactérie.

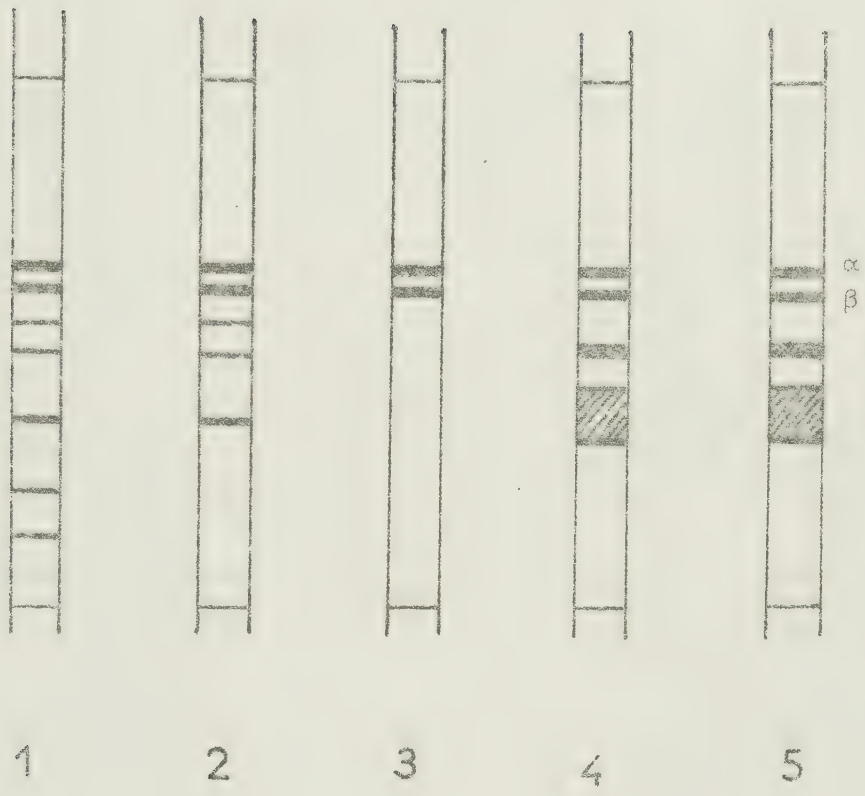
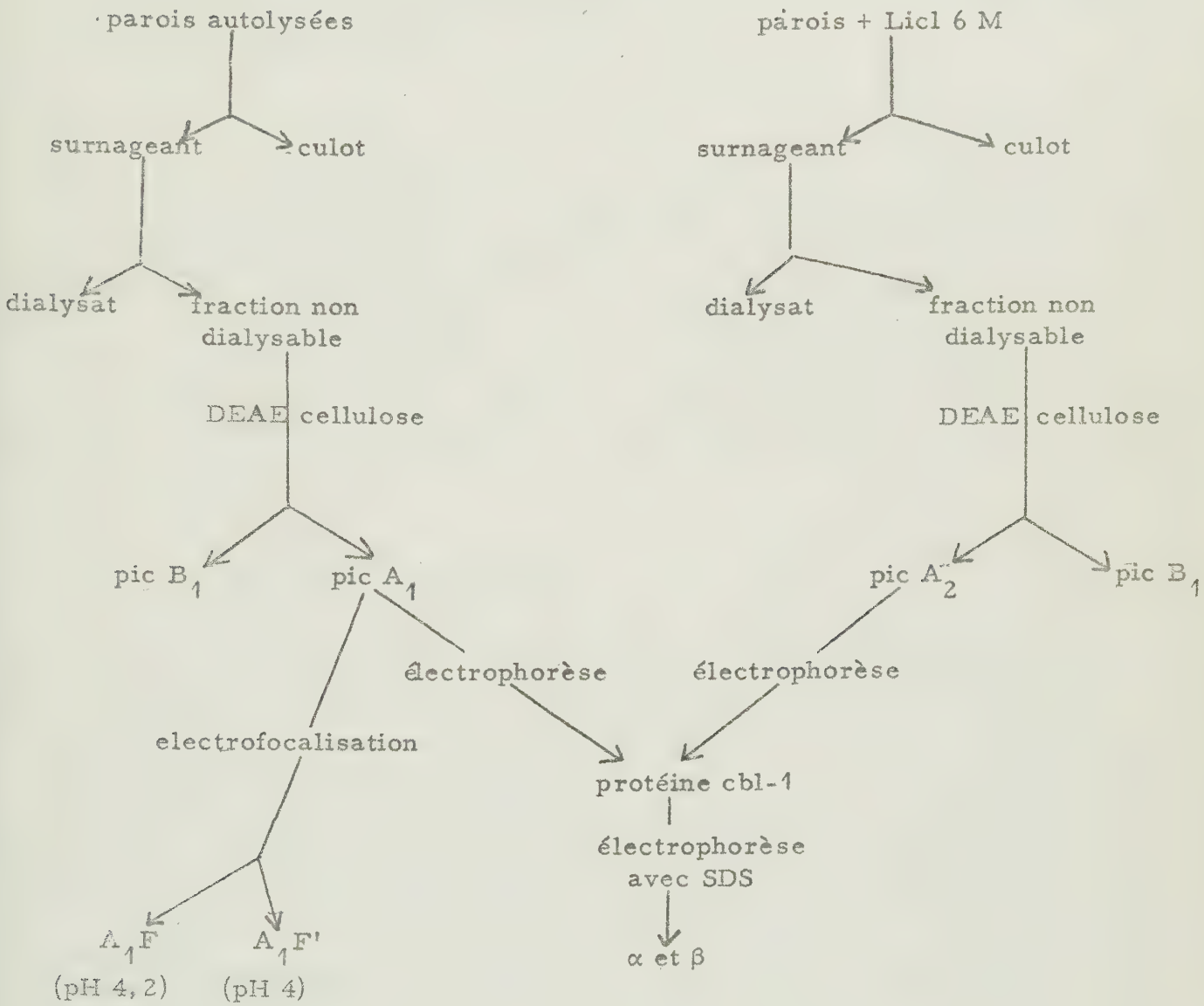


FIGURE 23

GELS D'ELECTROPHORESE DES BACTERIES AU COURS DES DIFFERENTS STADES DU CYCLE DE VIE DE LA BACTERIE.

Les électrophorèses sont réalisées sur des gels à 5 % en polycrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium 1 %. Les bactéries sont préalablement traitées par le mélange dodécylsulfate de sodium 1 % - urée 4 M 1% - 2-mercaptoéthanol 1 %, 1 heure à 37° C, puis trois minutes à 100° C.
(1) bactéries en phase exponentielle ; (2) bactéries en phase stationnaire ; (3) protéine A_2 (après DEAE-cellulose) ; (4) spores ; (5) spores additionnées de protéine A_2.

Schéma de purification de la protéine cbl-1



CHAPITRE IV

ETUDE DES MACROMOLECULES NON PROTEINIQUES DE LA PAROI DE B. subtilis cbl-1.

La protéine cbl-1, nous venons de le voir, confère à la paroi de B. subtilis cbl-1 une structure originale. A côté de cette protéine, qui est le constituant majoritaire, les analyses chimiques ont révélé l'existence d'autres polymères. En nous appuyant sur les résultats trouvés dans différentes souches de B. subtilis, nous allons étudier dans ce chapitre le problème des acides téïchoïques, la structure du peptidoglycane et l'existence d'autres polysaccharides.

A - Les acides téïchoïques.

Dans les parois de B. subtilis, les acides téïchoïques représentent 30 à 40% du poids de la paroi et sont, soit des polyglycérolphosphates, soit des polyribitolphosphates (134, 37, 52). Ces polymères sont substitués par de la D-alanine ou par du D-glucose (3), et seraient liés à l'acide muramique du peptidoglycane par une liaison ester phosphorique (68). Ils peuvent être solubilisés par autolyse (141) ou bien par hydrolyse acide ou alcaline ménagée (71). Dans la membrane cytoplasmique existe un acide téïchoïque, appelé acide téïchoïque membranaire qui est également un polyglycérolphosphate. Ce polymère est substitué par de la D-alanine ou du D-glucose et est lié à des lipides de la membrane par une liaison covalente (26).

Nous avons cherché à isoler l'acide téïchoïque membranaire de B. subtilis cbl-1 par extraction au phénol selon la méthode préconisée par HUGHES et coll. (69) et à le purifier partiellement par filtration sur gel de Sephadex G-200 selon BURGER et GLASER (21). Pour détecter ce polymère nous avons effectué des dosages de glucose, de glycérol et

d'alanine qui nous ont donné des résultats négatifs. Par contre, dans les mêmes conditions nous avons essayé de préparer l'acide téïchoïque membranaire de B. subtilis 168 wt et tous les dosages ont donné comme valeur : alanine/glycérol/glucose : 1/3/2.

Les enzymes qui participent à la biosynthèse des acides téïchoïques sont localisés dans la membrane cytoplasmique et parmi eux, la CDP-glycérol polyglycérolphosphate transférase polymérise le CDP-glycérol en polyglycérolphosphate. A l'aide de la méthode de HUGHES et coll. (69), nous avons préparé des membranes de B. subtilis cbl-1 pour tester cet enzyme à l'aide de CDP-glycérol ^{14}C et n'avons observé aucune incorporation, sous forme de polyglycérolphosphate. Avec des membranes de B. subtilis 168 wt préparées dans les mêmes conditions, nous avons obtenu une incorporation sous forme de polyglycérolphosphate de 22% du CDP-glycérol radioactif.

La fonction principale des acides téïchoïques et surtout des acides téïchoïques membranaires serait de lier des cations divalents (surtout l'ion magnésium) afin de maintenir une forte concentration ionique dans la membrane cytoplasmique, nécessaire à un certain nombre de biosynthèses de macromolécules aussi bien pariétales que intracellulaires (4). Chez B. subtilis cbl-1 où ces acides téïchoïques sont absents, il semble que ce soit la protéine cbl-1 qui les remplace dans ce rôle. En effet, un dosage de magnésium nous a montré que la protéine et la paroi de cette souche fixaient 30 équiv-g de magnésium/molécule de protéine et 38 équiv-g de calcium/molécule de protéine.

B - Le peptidoglycane de B. subtilis cbl-1

Le peptidoglycane, dans différentes souches de B. subtilis, représente 30 à 40% du poids de la paroi ; il est composé (70) de N-acétylglucosamine, d'acide N-acétylmuramique, d'acide D-glutamique et d'acide meso-diaminopimélique en quantité équivalente. La quantité totale d'alanine (composée de D et de L-alanine) est supérieure à celle

de l'acide meso-diaminopimélique. Pour deux souches, B. subtilis 168 et B. subtilis Porton, la structure globale de cette macromolécule a été déterminée. Ceci a pu être réalisé par deux méthodes différentes : l'autolyse et l'action du lysozyme (141, 68, 70, 134). Les résultats obtenus montrent, pour ce peptidoglycane, des structures pour ainsi dire identiques. Les chaînes de glycanes, linéaires, de longueurs variables (133, 134) sont composées d'acide N-acétylmuramique et de N-acétylglucosamine liés par des liaisons β 1 →4 glycosidiques (133, 134). Toutes les fonctions carboxyliques des résidus d'acide muramique sont substituées par le tétrapeptide L-Ala-γ-D-Glu-méso-DAP-D-Ala, appelé sous-unité peptidique. Pour B. subtilis 168 deux tiers de ces sous-unités sont liées (72) comme chez B. subtilis Porton (134).

Ce pontage se fait par une liaison peptidique entre le carboxyle d'un résidu de D-alanine C-terminal d'une sous-unité et une fonction amine de résidu d'acide diaminopimélique d'une autre sous-unité. Pour les deux souches, les carboxyles des acides diaminopiméliques non impliqués dans la liaison peptidique sont amidés (68, 134). Pour B. subtilis Porton, WARTH a montré que certaines fonctions carboxyliques des résidus d'acide N-acétylmuramique sont substituées par le dipeptide L-Ala-γ-D-Glu, ce qui montre que certaines des liaisons peptidiques D-Glu-meso-DAP ont été hydrolysées spécifiquement par une endopeptidase, soit pendant l'autolyse soit au cours de la croissance bactérienne.

a) Méthodes d'obtention du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1.

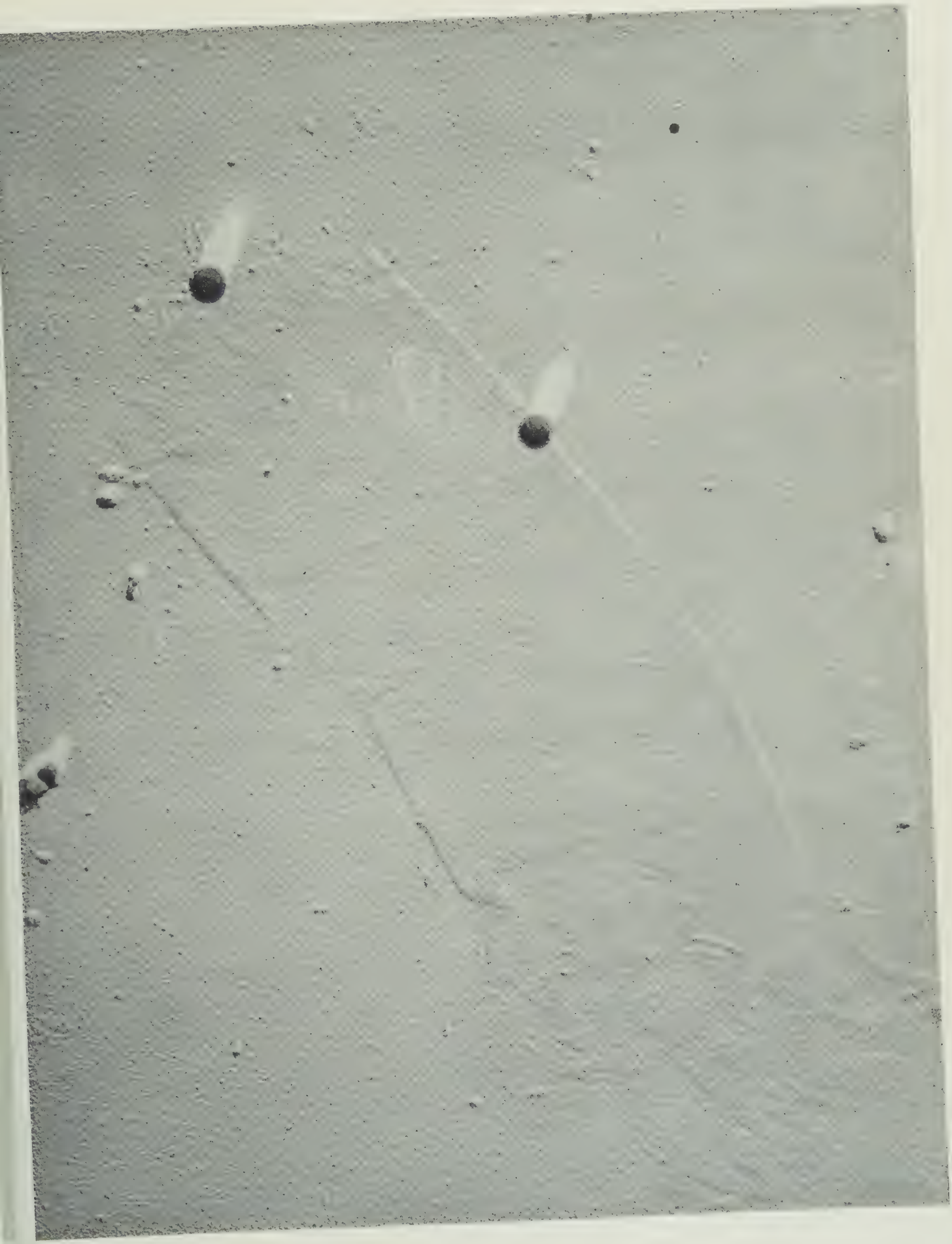
1) Action du dodécylsulfate de sodium à 2% sur la paroi :

Par action du dodécylsulfate de sodium à 2% sur la paroi (7) de B. subtilis cbl-1, nous obtenons un résidu insoluble composé par la totalité du peptidoglycane de la cellule auquel sont encore associés les polymères de galactosamine et glucosamine (cf. chapitre I) ; ce peptidoglycane ne contient plus de protéines (cf. Tableau V). Examiné par microscope électronique, il a un aspect très homogène (cf. figure 24).

FIGURE 24

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU PEPTIDOGLYCANE DE B. subtilis cbl-1.

Les échantillons de peptidoglycane, obtenus après traitement de la paroi de B. subtilis cbl-1 par le dodécylsulfate de sodium à 2 %, sont séchés sur la grille et ombrés par de l'uranium. Les billes de latex ont un diamètre de 109 nm.



Nous avons vu précédemment qu'après traitement par le tétroxyde d'osmium, les parois deviennent évanescentes (épaisseur : 3, 5 nm au lieu de 16 nm). Le peptidoglycane obtenu correspond à la couche médiane dense en électrons observées dans la figure 4b. Cette épaisseur faible nous fait penser plus au peptidoglycane d'une bactérie gram-négative qu'à celui d'une bactérie gram-positive.

2) Action du chlorure de lithium 6 M sur la paroi

Nous avons vu précédemment que le chlorure de lithium 6 M solubilisait en grande partie les protéines de la paroi et que dans la fraction insoluble restait la totalité du peptidoglycane encore associé à quelques protéines (cf. Tableau IX). Nous avons essayé d'obtenir un peptidoglycane pur en portant la suspension à 100° C pendant 45 minutes ou encore mieux en la traitant par du dodécylsulfate de sodium à 2% ; le résidu est alors un peptidoglycane aussi pur que celui obtenu par action directe sur la paroi de cet agent (cf. Tableau IX). Nous remarquons aussi que la décroissance de l'absorbance (85%) à 600 nm des parois traitées directement par le dodécylsulfate de sodium est la même que celle des parois traitées par le chlorure de lithium 6 M, puis par le dodécylsulfate de sodium à 2% (90%).

3) Action du dodécylsulfate de sodium sur les bactéries entières

Les résultats obtenus ci-dessus nous ont amenés, à traiter directement les bactéries entières par du dodécylsulfate de sodium à 2% (13) pour préparer le peptidoglycane de B. subtilis cbl-1. Le peptidoglycane obtenu, contient encore quelques protéines que nous avons éliminées par action du chlorure de lithium 6 M suivie de celle de la trypsine et de la pronase, ainsi que le polymère de galactosamine et glucosamine.

TABLEAU IX

Composés (nmoles/mg) paroi	LiCl Fraction insoluble	Chauffage à 100°C		SDS 2%	
		Fraction insoluble	Fraction soluble	Fraction insoluble	Fraction soluble
Asp	98	32	14	8	56
Thre	39	20	6	6	32
Ser	51	22	10	12	38
Glu	164	122	24	122	56
Gly	60	30	12	20	56
Ala	202	150	30	164	54
Val	-	150	72	18	200
Ile	5	10	traces	1	16
Leu	40	26	8	27	18
Mur	98	84	traces	80	traces
DAP	98	92	10	108	2
Glc	198	200	12	224	traces
Gal	98	98	traces	86	traces

La paroi de B. subtilis cbl-1 a été traitée par le chlorure de lithium 6 M, à 4° C. La fraction insoluble obtenue a été portée à 100° C et traitée par le dodécylsulfate de sodium à 2%.

4) Action enzymatique sur la paroi

Nous avons tenté d'obtenir le peptidoglycane en dégradant spécifiquement la partie protéique de la paroi par des protéases. Nous avons incubé des parois de B. subtilis cbl-1 (préalablement inactivées à 100° C) avec des enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine, et pronase). La plus grande solubilisation (48% seulement) a été obtenue avec ce mélange (cf. figure 25). Mais celle-ci est faible et montre que par cette méthode nous ne pouvons obtenir un peptidoglycane pur. Ces essais montrent que la couche protéique peut être dégradée partiellement par des protéases.

b) Caractérisation du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1

Nous avons établi la composition totale du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 (cf. Tableau X) et avons démontré qu'elle est comparable à celles d'autres souches de B. subtilis (70) et que la configuration des acides aminés est également la même. La L-alanine se trouve en quantité équivalente à l'acide meso-diaminopimélique et à l'acide D-glutamique et la configuration D intervient pour le reste de l'alanine.

c) Détermination de la structure du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1

Pour essayer de déterminer la structure globale du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1, nous avons procédé comme YOUNG (141), WARTH (134) et HUGHES (68) l'on fait, en faisant appel à l'autolyse et à l'action du lysozyme.

1 - Analyse des produits d'autolyse

La fraction dialysable du surnageant, obtenue après centrifugation de l'autolysat des parois, contient des fragments de peptidoglycane ainsi que des peptides non spécifiques. Une rhéoélectrophorèse à pH 2 de cette fraction donne une dizaine de tâches réagissant à la ninhydrine,

FIGURE 25

DEGRADATION ENZYMATIQUE DES PAROIS DE B. subtilis cbl-1 .

Les parois de B. subtilis cbl-1, inactivées par la température (30 minutes à 100° C) sont mises en suspension dans des tampons appropriés, puis incubées à 37° C dans un spectrophotomètre GILFORD thermostatisé. L'absorbance est lue à 600 nm. Lysozyme (100 µg/ml) dans le tampon phosphate de potassium 0,5 M pH 6,6 ; chymotrypsine (20 µg/ml dans le tampon Tris 0,1 M pH 8,2) ; trypsine (20 µg/ml dans le tampon Tris 0,1 M pH 8,2) ; pronase (20 µg/ml dans le tampon Tris 0,5 M pH 8,2).

Absorbance à 600 nm
0,1
0,5
1
2
3
4
heures
prunase
trypsine
chymotrypsine
lysozyme
contrôle

TABLEAU X

Composés (nmoles/mg) paroi	Parois non traitées	Peptidoglycane
Asp	592	16
Thré	292	8
Ser	256	12
Glu	448	112
Gly	307	7
Ala	469	146
Val	230	
Ile	103	traces
Leu	263	3
Mur	99	96
DAP	97	96
Glc	223	159
Gal	117	68
Lys	292	5
His	27	traces
Arg	92	1

Composition totale du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1.

Le peptidoglycane, obtenu par action du dodécylsulfate de sodium à 2% sur les parois de B. subtilis cbl-1 a été hydrolysé par HCl 6 N, 16 heures à 100° C.

dont deux ou trois enferment des sucres puisqu'elles sont positives au réactif de SHARON (119). Nous avons essayé de purifier ce mélange complexe par filtration sur gels de SEPHADEX G-50 et G-25, selon la méthode de TIPPER et STROMINGER (129). Nous avons alors obtenu deux pics principaux. Même après purification de ces deux pics par électrophorèse et chromatographie sur papier, les analyses en acides aminés et hexosamines indiquent que les produits isolés sont encore des mélanges de fragments de peptidoglycane et de peptides d'origine protéique. Nous n'avons pas poursuivi l'étude de ce mélange complexe. La présence de peptides non spécifiques, mélangés aux fragments de peptidoglycane, confirme l'existence d'une protéolyse que nous avons mise en évidence lors de l'étude de la partie protéique de cette paroi (cf. chapitre III).

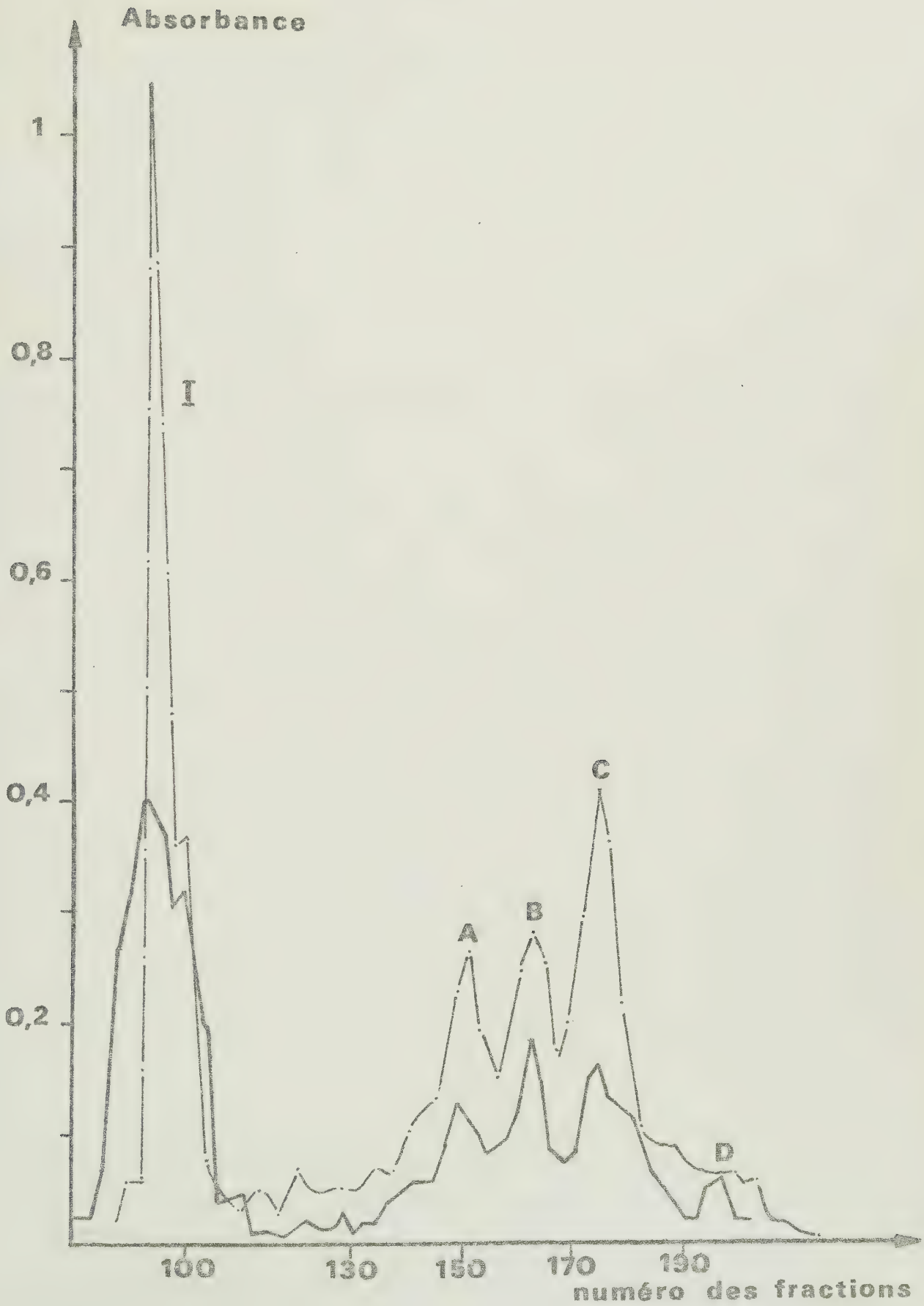
2 - Action du lysozyme sur le peptidoglycane de B. subtilis cbl-1

Grâce à sa spécificité, le lysozyme doit permettre d'obtenir un nombre restreint de fragments en agissant sur le peptidoglycane (70). Nous avons fait agir cet enzyme sur des parois entières de B. subtilis cbl-1 et n'avons obtenu que 20% de solubilisation (cf. figure 25) car la partie protéique doit gêner l'action de l'enzyme. En incubant pendant une nuit, le peptidoglycane de B. subtilis cbl-1, nous avons obtenu un taux de solubilisation de 68% . Après centrifugation, le surnageant a été lyophilisé. Le résidu, remis en solution, a été filtré sur gels de SEPHADEX G-50 et G-25 comme précédemment. Le diagramme d'élution obtenu (cf. figure 26) montre nettement une séparation entre les fragments de haut poids moléculaire (pic I) et ceux de faible poids moléculaire (pics A, B, C et D). Le pic I contient des fragments exclus des gels G-50 et G-25. L'analyse quantitative en acides aminés et hexosamines montre que nous sommes en présence de fragments de peptidoglycane auxquels sont liés tous les polymères de galactosamine et de glucosamine. Nous n'avons pas jusqu'à présent poursuivi l'étude de ces fragments.

FIGURE 26

FILTRATION SUR GELS DE SEPHADEX G-50 et G-25 DE LA FRACTION SOLUBLE OBTENUE APRES ACTION DU LYSOZYME SUR LE PEPTIDOGLYCANE DE B. subtilis cbl-1.

La fraction soluble obtenue après action du lysozyme est lyophilisée. Le résidu est repris par de l'eau, puis chromatographié sur deux colonnes de gels de SEPHADEX G-50 et G-25 montées en série. L'élution est effectuée par le tampon pyridine (0,1 M) - acide acétique pH 5,1. Pour chaque fraction nous avons dosé les sucres réducteurs (. —. —.) et les acides aminés N-terminaux (———). Le volume de chaque fraction est 2,1 ml –


Absorbance
A
1
0,8
0,6
0,4
0,2
I
A
B
C
D
100
130
150
170
190
numéro des fractions

Nous avons purifié chacun des pics A, B, C et D : par électrophorèse à pH 2 (1 heure, 40 V/cm) pour le pic A ; chromatographie sur papier Whatman N° 1 dans le système de solvants S_1, suivie d'une électrophorèse à pH 2 (1 heure, 40 V/cm) pour le pic B ; chromatographie sur papier Schleicher Schüll N° 2043 b dans le système de solvants S_2 pour le pic C. Cela nous a montré : que le pic A contenait cinq fragments désignés par A_1, A_2, A_3, A_4 et A_5, que le pic B ne contenait qu'un seul fragment comme le pic D d'ailleurs, et enfin que le pic C en contenait trois : C_1, C_2 et C_3. Pour chacun de ces fragments, nous avons déterminé la composition totale en acides aminés et hexosamines, l'extrémité aminée libre par dinitrophénylation (cf. Tableau XI). Le dosage des groupements amides nous a permis de connaître le nombre de ces groupements par rapport à la quantité d'acide diaminopimélique, mais ne nous indique pas leur position exacte dans le fragment peptidique isolé. Les résultats rassemblés dans le Tableau (XII) montrent que les fragments C_2 et C_3 ont un groupement amide, le fragment B en a un seul pour deux molécules d'acide diaminopimélique, et les fragments A_2 et A_3 en ont un par molécule d'acide diaminopimélique.

Le bilan concernant la dégradation et la purification des fragments sont rassemblés dans le Tableau (XIII). L'ensemble des résultats permet de proposer pour ces fragments les structures indiquées dans la figure 27b. La solubilisation par le lysozyme, suivie de la purification des fragments se fait avec un rendement de 70%. Nous avons obtenu un nombre de fragments plus important qu'après action du lysozyme sur le peptidoglycane de B. subtilis 168. En effet, HUGHES et coll. (70) ont isolé seulement deux sortes de fragments de faible poids moléculaire ayant pour structure :

NAG-NAM-Ala-Glu-DAP et $(\text{NAG-NAM-Ala-Glu-DAP})_2$-Ala

Pour le peptidoglycane de B. subtilis cbl-1, nous retrouvons ces structures dans les fragments A_2 et A_3 (30% des fragments dimères) et dans les fragments C_2 et C_3 (90% des fragments monomères). Mais nous avons aussi obtenu les fragments C_1, B et D (40% de l'ensemble des fragments monomères et dimères) qui montrent qu'une activité N-acétylmuramyl-L-alanine amidase a agi en même temps que le lysozyme, au cours de l'incubation.

TABLEAU XI

Composés	Glu	Ala	DAP	Mur	Glc
C_1	1,00	1,38	0,91	0	0
DNP-C_1	1,00	0,76	0,55	0	0
C_2	1,00	0,91	0,98	0,98	0,95
DNP-C_2	1,00	1	0	0,74	0,70
C_3	1,00	1,04	0,83	1,04	0,96
DNP-C_3	1,00	0,91	0	0,96	0,65
B'_1	1,00	1,40	0,95	0,52	0,52
DNP-B'_1	1,00	0,83	0,33	0,44	0,44
A_1	1,00	1,25	0,5	1,15	1,95
DNP-A_1	1,00	1,24	0,09	1,09	1,85
A_2	1,00	1,39	0,78	1,03	1,03
DNP-A_2	1,00	1,32	0,40	1	1,08
A_3	1,00	1,36	0,80	0,92	0,96
DNP-A_3	1,00	1,16	0,40	0,76	0,80
A_4	1,00	1,27	0,64	0,64	0,68
DNP-A_4	1,00	0,92	0,36	0,56	0,60
A_5	1,00	1,27	0,66	0,50	0,50
DNP-A_5	1,00	1,10	0,48	0,62	0,55

Composition en acides aminés et hexosamines des fragments isolés après action du lysozyme sur le peptidoglycane de B. subtilis cbl-1

Les analyses ont été effectuées, après hydrolyse (HCl 6 N, 16 heures à 100° C) sur les fragments isolés et sur leurs dérivés dinitrophénylés.

TABLEAU XII

Composés	C_1	C_2	C_3	B'_1	A_2	A_3
$\frac{NH_3}{DAP}$	0,66	0,84	0,97	0,50	0,81	1,15

DETERMINATION DES GROUPEMENTS AMIDES DE CERTAINS FRAGMENTS ISOLES APRES ACTION DU LYSOZYME SUR LE PEPTIDOGLYCANE DE *B. subtilis* cbl-1.

Le nombre des groupements amides ont été déterminés par la quantité d'ammoniac libérée et rapportée pour chaque fragments à la quantité d'acide diaminopimélique.

TABLEAU XIII

Composés	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	B	C_1	C_2	C_3	D
DAP (nmoles)	80	440	400	112	288	1000	660	920	160	96

← dimères → ← monomères →

Quantité des différents fragments de peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 obtenus après hydrolyse par le lysozyme.

Une quantité de peptidoglycane, correspondant à 20, 6 µmoles d'acide diaminopimélique, a été incubée en présence de lysozyme. Le pic I contient 5, 6 µmoles d'acide diaminopimélique. La quantité de fragments dimères est de 3 µmoles et les quantités de fragments monomères est de 1, 2 µmoles (rapportées à l'acide diaminopimélique).

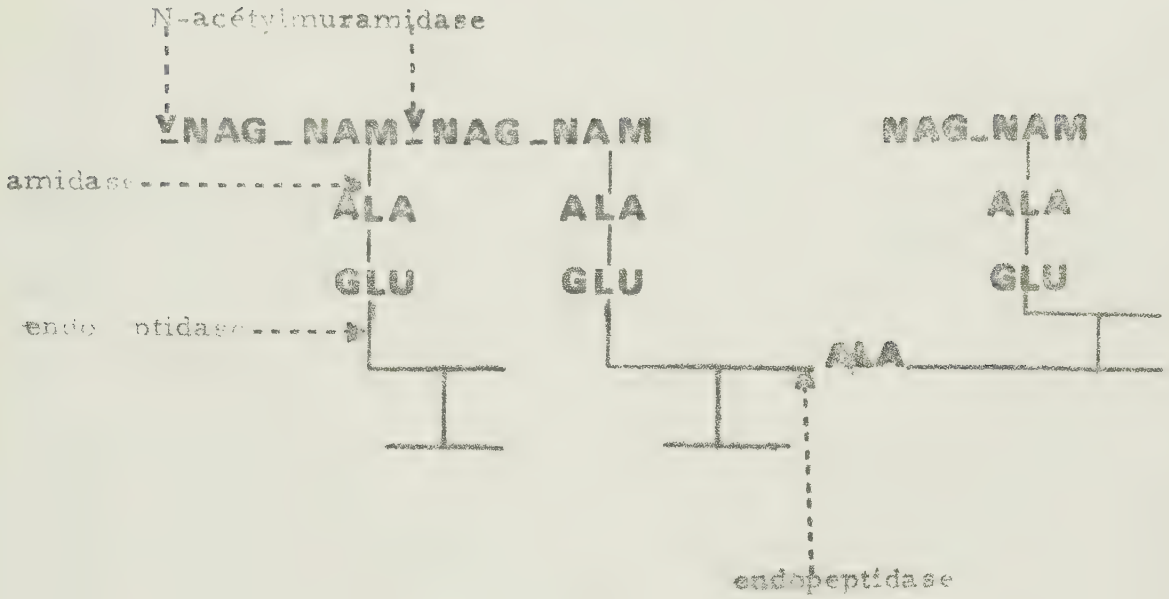


Figure 27a

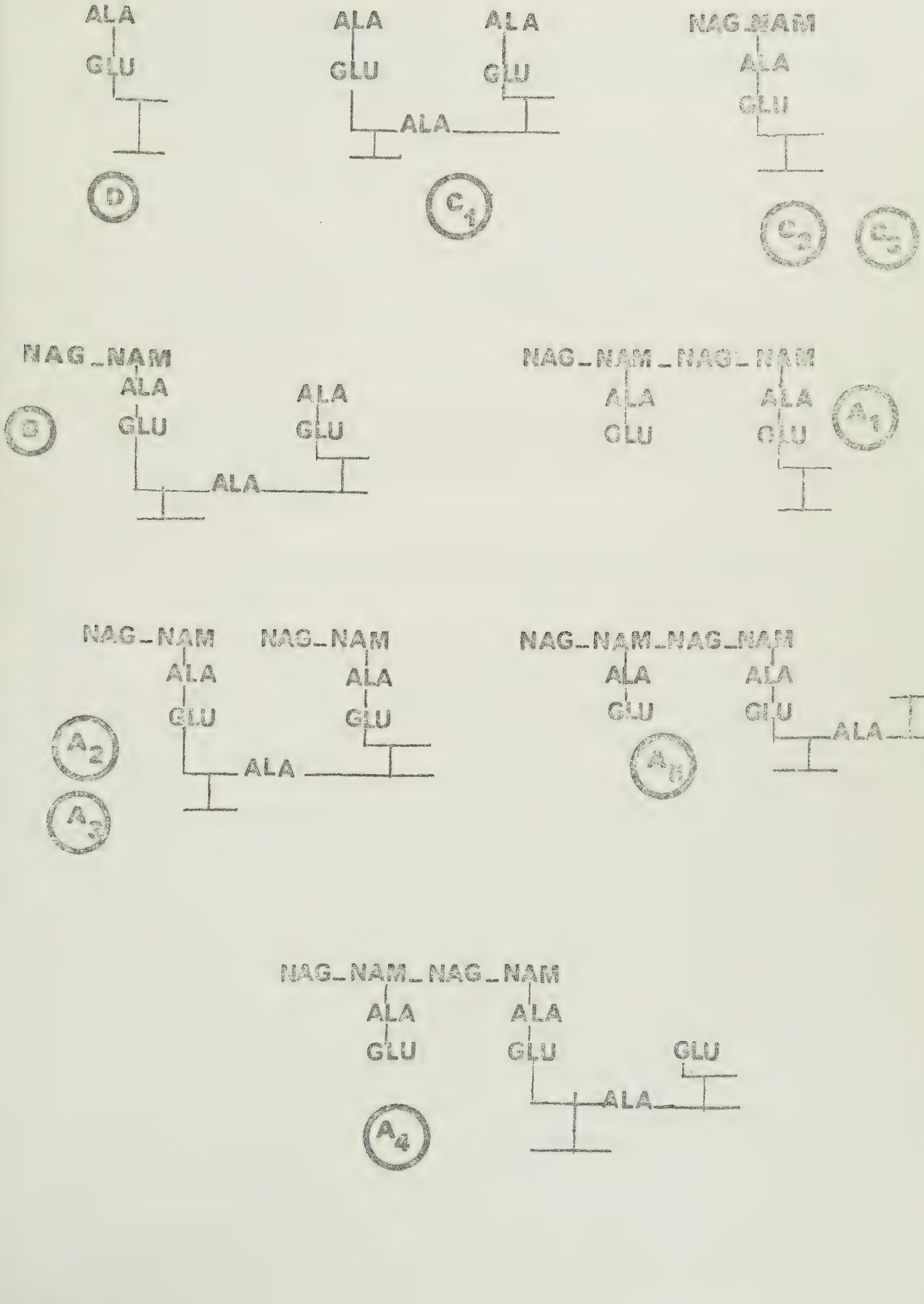
Points d'action sur le peptidoglycane d'enzymes hydrolytiques

Les fragments de la figure 27b peuvent être expliqués par action de ces différents enzymes.

FIGURE 27 b

FORMULES PROPOSEES POUR LES DIFFERENTS FRAGMENTS ISOLES APRES ACTION DU LYSOZYME SUR LE PEPTIDOGLYCANE DE B. subtilis cbl-1 .

Le fragment C_3 (17% de C_2) est identique au fragment C_2 et ces deux fragments doivent différer soit par la position de la fonction amide, soit par une désacétylation d'un des sucres. Les fragments A_2 et A_3 ont aussi des structures identiques et doivent avoir entre eux les mêmes différences que C_2 et C_3.


ALA
GLU
D
ALA
GLU
ALA
GLU
ALA
C1
NAG_NAM
ALA
GLU
C2
C3
NAG_NAM
ALA
GLU
ALA
GLU
ALA
B
NAG_NAM_NAG_NAM
ALA
GLU
ALA
GLU
A1
NAG_NAM
ALA
GLU
NAG_NAM
ALA
GLU
ALA
A2
A3
NAG_NAM_NAG_NAM
ALA
GLU
ALA
GLU
ALA
A4
NAG_NAM_NAG_NAM
ALA
GLU
ALA
GLU
GLU
ALA
A4

Cette activité provient du système autolytique qui est resté lié au peptidoglycane de la bactérie malgré les traitements employés pour purifier cette macromolécule (cf. chapitre V).

L'examen de la structure des fragments A_1, A_4 et A_5 démontre qu'une activité endopeptidasique existe chez B. subtilis cbl-1. En effet, dans les fragments A_1, A_4 et A_5 les carboxyles des résidus d'acide N-acétyl-muramique sont substitués par le dipeptide L-Ala-D-Glu. Ces fragments ressemblent à des fragments que WARTH a isolés par autolyse du peptidoglycane de B. subtilis Porton.

Pour éviter toute interférence avec des activités lytiques endogènes, nous avons inactivé le peptidoglycane à 100° C (cf. chapitre I) avant de l'incuber avec le lysozyme.

3 - Action du lysozyme sur le peptidoglycane inactivé de B. subtilis cbl-1.

Après incubation d'une nuit du peptidoglycane avec le lysozyme, nous avons obtenu 96% de solubilisation. Le surnageant a été lyophilisé et le résidu, solubilisé par de l'eau, a été chromatographié sur gels de Séphadex G-50 et G-25 comme précédemment. Le profil d'élution obtenu (cf. figure 28) montre trois pics I', A' et B' nettement séparés. Les fragments contenus dans le pic I' sont exclus des gels. L'analyse quantitative globale en acides aminés et en hexosamines montre qu'il s'agit de fragments de peptidoglycane auxquels sont liés les polymères de galactosamine et glucosamine. Comme précédemment, nous n'avons pas poursuivi l'étude de ces fragments. Mais nous avons purifié les fragments des pics A' et B' par chromatographie sur papier Schleicher Schüll n° 2043 b dans le système de solvants S_3 suivie d'une électrophorèse à pH 2 (1 heure, 40 V/cm). Le pic A' a donné trois fragments que nous désignons par A'_1, A'_2 et A'_3 ; le pic B' a donné trois peptides en faible quantité et non spécifiques du peptidoglycane. Nous avons poursuivi seulement l'étude des fragments A'_1, A'_2 et A'_3 en déterminant leur composition totale et leur extrémité aminée terminale (cf. Tableau XIV). Le bilan de cette dégradation enzyma-

FIGURE 28

FILTRATION SUR GELS DE SEPHADEX G-50 et G-25 DE LA FRACTION SOLUBLE OBTENUE APRES ACTION DU LYSOZYME SUR LE PEPTIDOGLYCANE DE B. subtilis cbl-1 INACTIVE.

La fraction soluble, obtenue après action du lysozyme est lyophilisée. Le résidu est repris par de l'eau puis chromatographié sur deux colonnes de gels de SEPHADEX G-50 et G-25 montées en série. L'élution est effectuées par le tampon pyridine (0,1 M) - acide acétique pH 5,1. Pour chaque fraction nous avons dosé les sucres réducteurs.

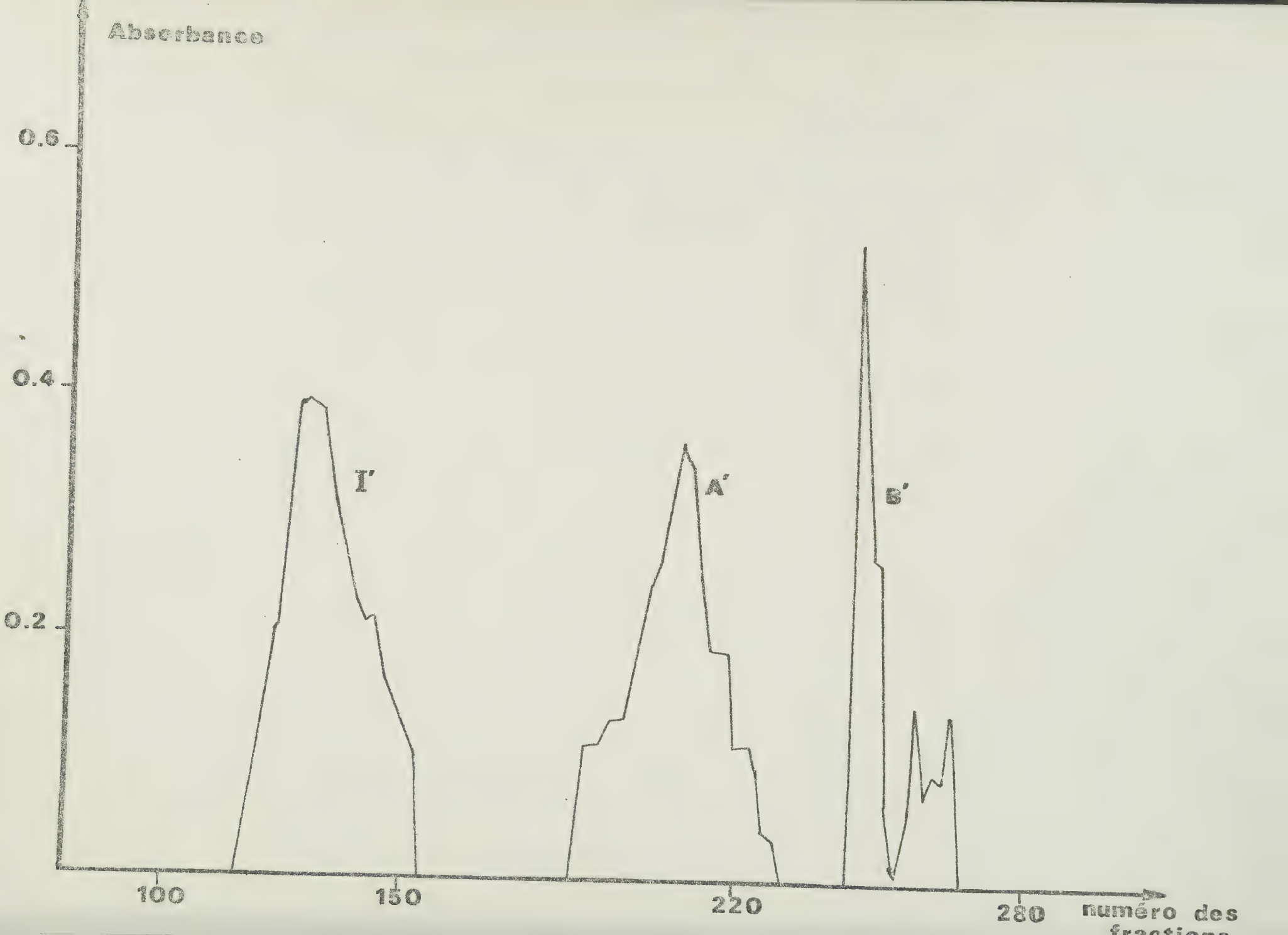

Absorbance
0.6
0.4
0.2
I'
A'
B'
100
150
220
280
numéro des fractions

TABLEAU XIV

Composés	Mur	Glc	Glu	Ala	DAP
A'_1	1	1,2	1	1,3	1,15
DNP-A'_1	0,94	1,41	1	1,29	0,59
A'_2	0,60	0,68	1	1,36	1,12
DNP-A'_2	0,56	0,87	1	1,08	0,52
A'_3	0,90	1,01	1	1,01	1,10
DNP-A'_3	0,83	1,03	1	1	0,06

Composition en acides aminés et hexosamines des fragments solubilisés par le lysozyme après action sur le peptidoglycane de B. subtilis cbl-1.

Les analyses ont été effectuées, après hydrolyse acide (HCl 6 N 16 heures à 100° C) sur les fragments isolés et sur leurs dérivés dinitrophénylés.

tique suivie de la purification des fragments est donnée dans le Tableau XV. Nous récupérons 83% des fragments solubilisés. L'ensemble des résultats permet de proposer pour ces fragments des structures indiquées dans la figure 29.

Dans ces conditions de dégradation, nous obtenons un nombre limité de fragments de faible poids moléculaire, comme dans le cas de HUGHES et coll. pour B. subtilis 168 (70). Ces fragments représentent pour cette bactérie 40 à 50% du peptidoglycane alors qu'il en représente seulement 6% pour B. subtilis cbl-1. Ces résultats montrent l'inefficacité du lysozyme sur cette structure quand il n'est pas assisté par l'amidase endogène. La dégradation limitée provoquée par le lysozyme conduit à 96% de solubilisation et fournit essentiellement des fragments de haut poids moléculaire. Par ailleurs, nous remarquons que les rapports molaires du monomère par rapport au dimère est 2/1 alors que HUGHES et coll. avaient trouvé 1,2/1 pour B. subtilis 168 (70).

4 - Degré de pontage des chaînes peptidiques.

La dinitrophénylation permet de doser le nombre de fonctions aminées libres dans l'acide diaminopimélique. Le rapport entre la quantité de dérivé monodinitrophényle acide diaminopimélique et la quantité totale d'acide diaminopimélique du peptidoglycane détermine le degré de pontage qui est le pourcentage de sous-unités peptidiques impliquées dans un pontage. Ce rapport a été déterminé avec le peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 par deux méthodes différentes (cf. chapitre I) et nous a donné en moyenne une valeur de 63% . Pour le peptidoglycane de B. subtilis Porton, WARTH (134) a trouvé un taux de 65% et pour celui de B. subtilis 168 HUGHES (72) a trouvé 67% . Ces trois souches ont donc le même degré de pontage.

TABLEAU XV

Composés	A'_1	A'_2	A'_3
DAP (nmoles)	92	112	416

Quantités de fragments obtenus après hydrolyse du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 (préalablement inactivé par le lysozyme).

Une quantité de peptidoglycane correspond à 11, 52 µmoles d'acide diaminopimélique a été incubée en présence de lysozyme. Le pic I' contient 9 µmoles d'acide diaminopimélique. La quantité de fragments monomères est de 0, 41 µmoles et celle de fragments dimères de 0, 2 µmole (rapportés à l'acide diaminopimélique).

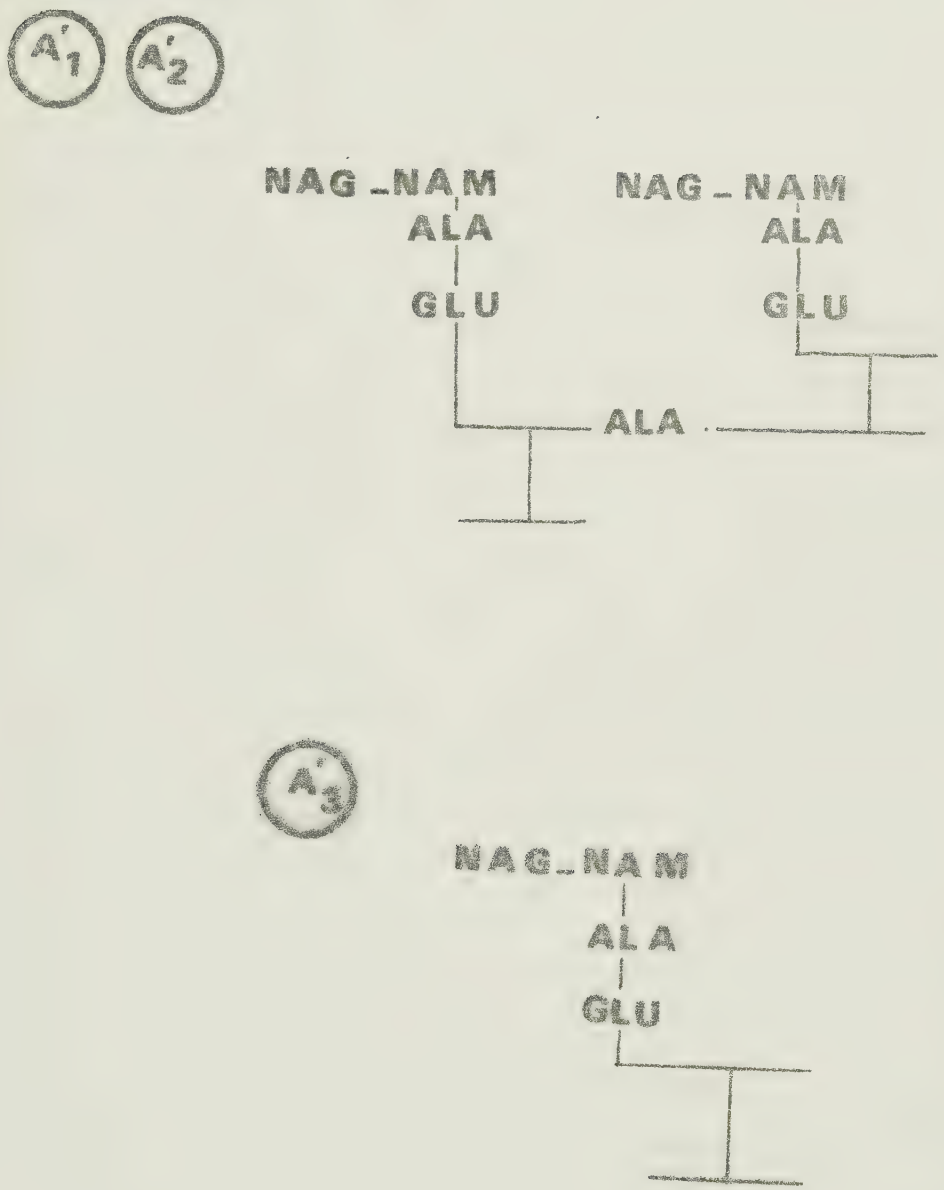


figure 29

FORMULES PROPOSEES POUR LES DIFFERENTS FRAGMENTS ISOLES APRES ACTION DU LYSOZYME SUR LE PEPTIDOGLYCANE DE *B. subtilis* cbl-1.

C - Les polysaccharides de la paroi de B. subtilis cbl-1

La paroi de B. subtilis cbl-1 contient de la galactosamine. Par ailleurs, elle contient une quantité de glucosamine supérieure à celle de l'acide muramique. On sait que l'acide muramique et la glucosamine interviennent en quantité équivalente dans la structure du peptidoglycane. Donc il est raisonnable de penser que l'excès de glucosamine doit former avec la galactosamine un polymère. En effet, par autolyse, nous avons retrouvé toute la galactosamine et l'excès de glucosamine dans la fraction non dialysable du surnageant obtenue après centrifugation de l'autolysat (cf. Tableau IV). Par action sur la paroi du dodécylsulfate de sodium à 2% (cf. Tableau V), ainsi que par action du chlorure de lithium √6 M (cf. Tableau VI), nous retrouvons ce polymère qui représente 5% de la paroi de B. subtilis cbl-1 lié au peptidoglycane (cf. Tableau VIII). DUCKWORTH et coll. (33) ont montré pour la paroi de B. subtilis 168, qu'à côté de l'acide téïchoïque et du peptidoglycane, existaient trois autres polymères : un polymère de glycosyl-N-acétylgalactosamine-1-phosphate, un polymère de glucose-1-phosphate et un polymère de N-acétylgalactosamine. Ce dernier contient la moitié de la galactosamine de la paroi. Il est lié au peptidoglycane par une liaison covalente stable car il n'est pas solubilisé par hydrolyse acide ou alcaline ménagée, contrairement au deux autres. Le polymère de galactosamine et glucosamine de la paroi de B. subtilis cbl-1 paraît ressembler à celui que DUCKWORTH et coll. a mis en évidence chez B. subtilis 168, car, comme lui, il n'est pas solubilisé par hydrolyse acide ou alcaline ménagée et doit donc être lié au peptidoglycane par une liaison covalente stable. Par ailleurs, les polymères de glucose-1-phosphate et de glycosyl-N-acétylgalactosamine-1-phosphate n'existent pas dans la paroi de B. subtilis cbl-1 puisque cette paroi ne contient ni glucose ni phosphate.

Afin de savoir si d'autres polysaccharides existaient dans la paroi de B. subtilis cbl-1, nous avons dosé les sucres neutres selon DUBOIS et coll. (32) ainsi que les sucres uroniques selon DISCHE (30). Les résultats de ces dosages ont été négatifs et semblent indiquer qu'aucun autre polysaccharide n'existe, excepté celui de galactosamine et glucosamine dont nous venons de parler.

Ces polysaccharides ne représentent que 5% du poids de la paroi, ce qui permet d'expliquer les images obtenues au microscope électronique après coloration de THIERY et de RAMBOURG (figures 5, 6, 7). Par ailleurs, on peut penser que ces polysaccharides liés au peptidoglycane émergeraient à la surface en formant des filaments à travers la couche de protéine cbl-1 (figure 34).

Résumé

B. subtilis cbl-1 ne possède ni acide téïchoïque pariétal, ni acide téïchoïque membranaire qui jouent le rôle de réserve de cations divalents pour la cellule. Son peptidoglycane a une structure globale qui ressemble à celles de B. subtilis Porton et B. subtilis 168. Le degré de pontage de ce peptidoglycane est de 63%. L'action du lysozyme sur ce polymère non inactivé nous a permis de mettre en évidence la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase du système autolytique.

La paroi de B. subtilis cbl-1 ne contient aucun polymère de phosphate ; on trouve covalentiellement lié au peptidoglycane un polymère à base de galactosamine et de glucosamine.

CHAPITRE V

LE SYSTEME AUTOLYTIQUE DE B. subtilis cbl-1

A - Rappel des données sur le système autolytique de B. subtilis.

L'autolyse de la paroi bactérienne est un phénomène complexe dont l'étude a été, en particulier, développée ces dernières années chez B. subtilis. YOUNG et coll. (145, 146) ont montré que les parois isolées de B. subtilis 168 s'autolysent rapidement, par suite essentiellement de l'hydrolyse enzymatique du peptidoglycane. Cette dégradation s'effectue avec la libération de résidus d'alanine N-terminaux, mais sans augmentation de pouvoir réducteur. Ceci montre qu'une N-acétylmuramyl-L-alanine amidase constitue la principale activité de ce système autolytique. Cette autolysine, dont le pH optimum est à 9, est fortement liée à la paroi et peut être solubilisée soit par autolyse (142), soit en traitant à froid les parois par du chlorure de lithium (38). Cette activité amidasique serait associée aux acides téïchoïques (19, 63). Par ailleurs, dans plusieurs souches de B. subtilis, à côté de l'amidase il a été mis en évidence des activités glycosidasiques (20, 100a, 132).

Les autolysines jouent un rôle important pour la bactérie. Elles sont nécessaires à la croissance et à la division cellulaire (42, 51). FAN et BECKMAN (39, 41) ont isolé un mutant de B. subtilis de morphologie irrégulière, formant des bâtonnets, dont la croissance anormale est restaurée par l'addition de lysozyme ou d'autolysines. Par ailleurs, chez B. subtilis, le système autolytique hydrolysant les macromolécules pariétales est impliqué dans le renouvellement de la paroi (90). En effet, il a été montré que, en une génération, la moitié du peptidoglycane et la moitié des acides téïchoïques étaient renouvelés. Pour les acides téïchoïques, une activité téïchoïcasique interviendrait (137). D'autre part, ces enzymes autolytiques pourraient jouer un rôle dans le phénomène de compétence (1, 126). Bien que le système autolytique

de B. subtilis soit celui pour lequel nous ayons, à l'heure actuelle, le plus de connaissances, l'ensemble des résultats est encore très fragmentaire. Malgré cet inconvénient, nous avons tenu, néanmoins, à examiner le problème des autolysines chez B. subtilis cbl-1.

B - Le système autolytique de B. subtilis cbl-1.

Les parois de B. subtilis cbl-1, préparées par cassage avec des billes de verre, ayant subi des lavages répétés par de l'eau, s'autolysent de façon prépondérante à pH 6,6 et faiblement à pH 9 (cf. figure 30), mais à ces deux valeurs aucune libération de résidus d'alanine N-terminaux n'est observée. En outre, compte tenu des interférences possibles, dues à la forte proportion de protéines présentes dans ces parois, nous avons effectué aussi une recherche de résidus d'alanine N-terminaux sur la fraction dialysable du surnageant de l'autolyse à pH 6,6 qui contient surtout des fragments de peptidoglycane (cf. chapitre III). Nous n'avons pas décelé de résidus d'alanine N-terminaux. Pour exclure la possibilité de l'élimination de la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase au cours des nombreux lavages, nous avons cherché à mettre en évidence cette activité sur des parois brutes non lavées. A pH 6,6 comme à pH 9 l'amidase n'a pas été détectée. Par contre, au pH optimum d'autolyse (pH 6,6), nous avons obtenu une libération très nette de pouvoir réducteur (cf. figure 31). Le système autolytique, associé à la paroi de B. subtilis cbl-1 comporte donc une activité glycosidasique.

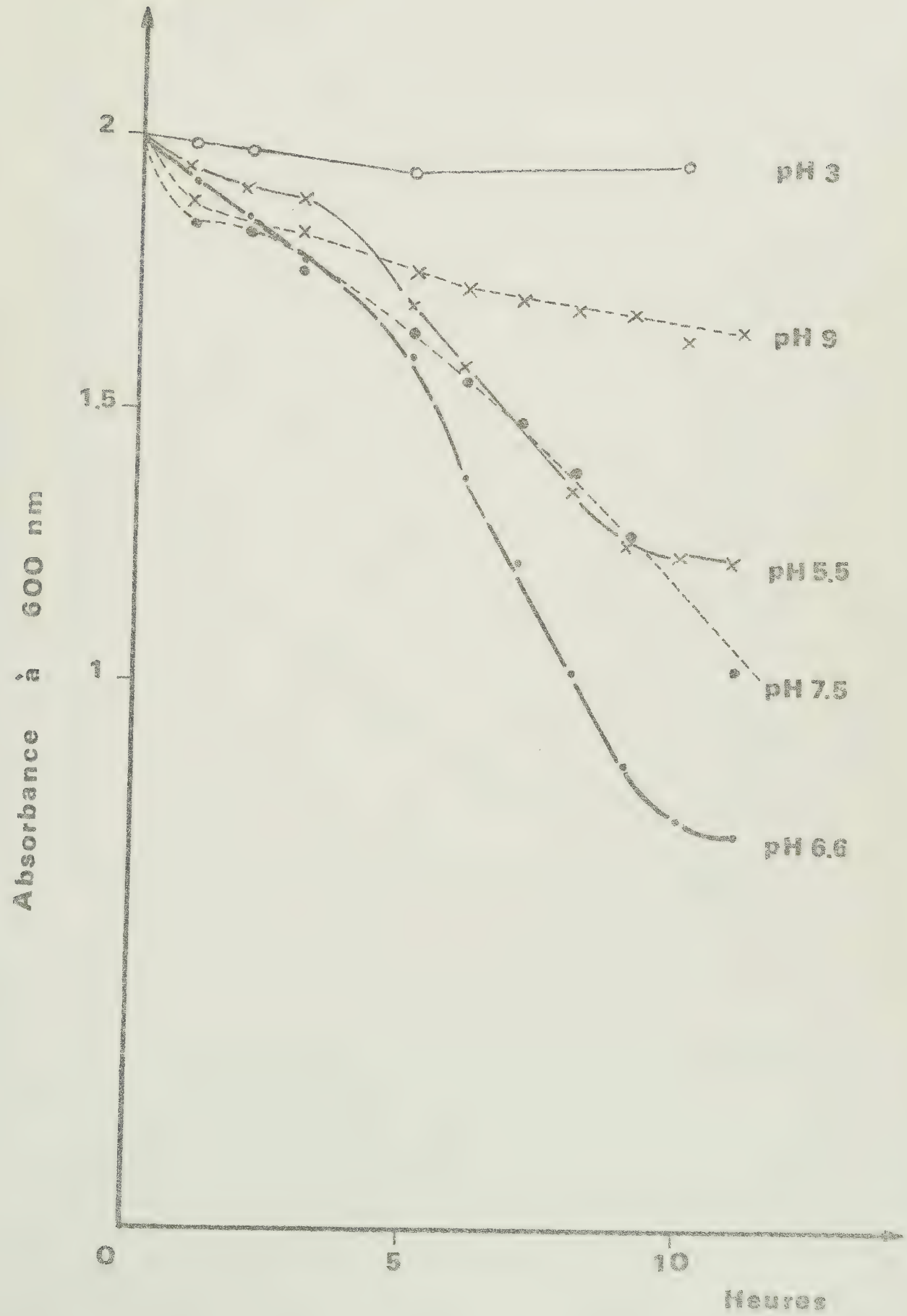
a) Mise en évidence d'une activité N-acétylmuramyl-L-alanine amidasique.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que, lors de l'incubation du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 avec le lysozyme, nous avons obtenu une forte proportion de liaisons N-acétylmuramyl-L-alanine rompues.

FIGURE 30

AUTOLYSE DES PAROIS DE B. subtilis 168 cbl-1 A DIFFERENTES VALEURS DE pH.

Les parois sont mises en suspension (4 mg/ml) dans les tampons 0,05 M suivants : citrate de sodium pour pH 2 à 3 ; acétate d'ammonium pour pH 4 à 6 ; phosphate de potassium pour pH 6 à 8 ; carbonate d'ammonium pour pH 9 : les incubations sont réalisées à 37° C.


Absorbance à 600 nm
2
1.5
1
0
5
10
Heures
pH 3
pH 9
pH 5.5
pH 7.5
pH 6.6

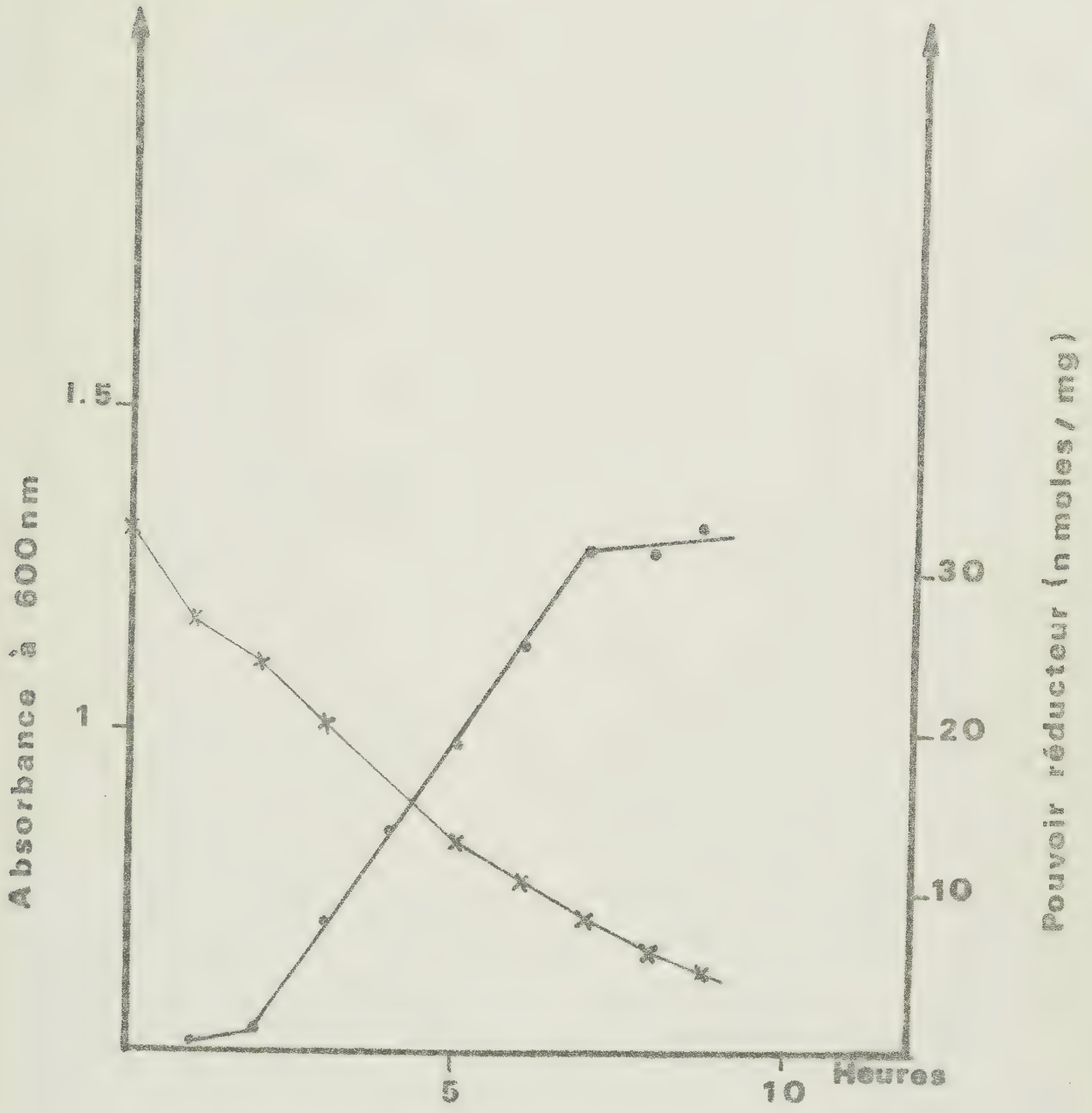


FIGURE 31

CINETIQUE D'AUTOLYSE A pH 6,6 EN PARALLELE AVEC LA CINETIQUE DE LIBERATION DES SUCRES REDUCTEURS

Les parois de B. subtilis cb1-1 sont suspendues (2mg/ml) dans du tampon acétate d'ammonium 0,05 M pH 6,6 et sont incubées à 37° C. Au cours du temps, nous avons prélevé des échantillons sur lesquels nous avons dosé les sucres réducteurs.

Ces résultats montrent clairement que la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase est restée associée au peptidoglycane malgré les traitements utilisés pour purifier cette macromolécule. Pour confirmer ce fait, nous avons étudié l'autolyse du peptidoglycane à pH 6,6 ainsi qu'à pH 9. Dans les deux cas, nous avons obtenu un taux important d'autolyse (66 et 84% respectivement). Nous avons observé une augmentation de pouvoir réducteur à pH 6,6 seulement. Et contrairement à l'autolyse des parois, nous avons obtenu une libération de résidus d'alanine N-terminaux et en outre, cette libération est plus importante à pH 9 qu'à pH 6,6 (avant autolyse Ala/Glu = 1,38 ; après autolyse à pH 6,6 Ala/Glu = 0,80 ; après autolyse à pH 9 Ala/Glu = 0,60). Ces résultats montrent que chez B. subtilis cbl-1 il y a au moins deux activités autolytiques.

Il existe donc un désaccord entre les résultats obtenus par autolyse des parois et ceux obtenus par autolyse du peptidoglycane. La présence d'activité N-acétylmuramyl-L-alanine amidasique n'a pu être détectée dans les parois lavées ou brutes. Afin de déterminer si elle n'est pas présente sous forme cryptique nous avons tenté de l'extraire de ces parois selon la méthode de FAN (38). Nous avons alors extrait des parois de B. subtilis cbl-1 par du chlorure de lithium 3 M à 0° C, et testé l'activité enzymatique. Le surnageant obtenu a été incubé à pH 9 en présence de parois de la souche B. subtilis 168(dont le système autolytique a été préalablement inactivé). Nous avons observé une diminution de 30% de l'absorbance à 600 nm ainsi qu'une libération de résidus d'alanine N-terminaux (paroi avant autolyse : Ala/Glu = 1,98 ; après autolyse à pH 9 : Ala/Glu = 1,33) ce qui montre bien que nous avons extrait une activité amidasique.

En conclusion, nous pouvons dire que l'amidase existe dans le systèmes autolytique de B. subtilis cbl-1 car :

- le peptidoglycane s'autolyse avec libération de résidus d'alanine N-terminaux ;

- le chlorure de lithium 3 M permet l'extraction de cette activité ;
- les fragments A_4, B, C_1 et D isolés lors de l'étude de la structure globale du peptidoglycane (cf. chapitre V) montrent que la liaison amide entre un résidu d'acide N-acétylmuramique et un résidu de L-alanine a été hydrolysée.

B. subtilis cbl-1, nous l'avons vu, ne contient pas du tout d'acide téïchoïque. L'ensemble de ces résultats peut donc expliquer pourquoi nous ne détectons pas l'activité amidasique du moins associée avec les parois. Cette activité semble donc contrôlée. Chez E. coli (93, 59) le phénomène spontané d'autolyse des enveloppes isolées n'existe pas, et peut être déclenché par des traitements divers (trypsine, acide trichloracétique, chlorure de sodium et dodécylsulfate de sodium à 2 %) ce qui montre que même chez ce microorganisme les autolysines sont également sous contrôle. HARTMAN et coll. (59) ont suggéré l'existence d'une véritable barrière entre les enzymes autolytiques et le peptidoglycane. Peut être est-ce la raison pour laquelle chez B. subtilis cbl-1 l'activité N-acétylmuramyl-L-alanine amidasique n'est pas active dans les parois isolées et n'agit sur le peptidoglycane qu'après congélation et décongélation des bactéries suivies de traitements par le dodécylsulfate de sodium à 2% et par la trypsine.

b) Activité glycosydasique.

Pendant l'autolyse à pH 6,6 des parois de B. subtilis cbl-1 nous pouvons suivre tout au cours du temps une libération de sucres réducteurs (cf. figure 31), ce qui démontre l'existence d'une glycosidase dans le système autolytique. Nous avons cherché à déterminer la spécificité de cette glycosidase, présente dans la fraction insoluble (obtenue après action du chlorure de lithium 6 M) de la paroi de B. subtilis cbl-1, débarrassée de la partie protéique (cf. chapitre III), mais contenant la totalité du peptidoglycane et le système autolytique. Par la technique de HARA et MATUSHIMA (58), nous avons déterminé la nature de l'hexosamine à

l'extrémité réductrice des fragments présents dans l'autolyse à pH 6,6. A l'aide de cette méthode, nous avons trouvé que 64% de l'acide muramique de l'autolysat avait disparu tandis que la quantité de glucosamine est restée constante. De plus, la quantité de muramicitol obtenue est équivalente à la quantité d'acide muramique disparue. Nous pouvons donc en conclure que la glycosidase du système autolytique associée à la paroi de B. subtilis cbl-1 est une N-acétylmuramidase.

Par la même méthode, nous avons analysé l'autolysat, obtenu à pH 5,5 des parois de la souche B. subtilis 168 wt et avons trouvé que la glycosidase est une N-acétylglucosaminidase ce qui confirme les résultats de WARD (132).

Nous avons essayé de solubiliser la glycosidase de B. subtilis cbl-1 par action du chlorure de lithium sur des parois de B. subtilis 168 wt inactivées, nous n'avons détecté aucune libération de pouvoir réducteur, ce qui montre que la glycosidase n'a pas été solubilisée. Mais dans le culot d'extraction, il reste une activité autolytique dont nous n'avons pas déterminé la nature, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par FAN qui a noté que le système autolytique de B. subtilis 168 n'était pas complétement solubilisé par le chlorure de lithium. D'autre part, après neuf heures d'autolyse à pH 6,6, les parois de B. subtilis cbl-1 ont été centrifugées et le surnageant a été incubé en présence de parois de B. subtilis cbl-1 (dont le système autolytique a été préalablement inactivé), ainsi qu'en présence de parois de B. subtilis 168 wt traitées de la même façon. Dans les deux cas, nous avons obtenus une libération de sucres réducteurs, démontrant que l'autolyse a permis de solubiliser la glycosidase de B. subtilis cbl-1.

c) Quelques propriétés du système autolytique étudié.

1 - Effet du pH sur l'autolyse.

Les autolysines de B. subtilis cbl-1, nous l'avons vu, agissent à pH 6,6 et faiblement à pH 9. Nous avons alors voulu savoir comment le phénomène d'autolyse se comportait à différents pH. Pour cela, nous

avons effectué des autolyses de parois dans des tampons de pH différents, mais de même concentration. Les résultats obtenus (cf. figure 30) montrent que, entre pH 5 et pH 9, les cinétiques d'autolyse sont biphasiques. A pH 4,2, les parois précipitent au bout de deux heures. Cette valeur correspond au point isoélectrique de la protéine cbl-1 (cf. chapitre III). A pH 2 et à pH 3, il n'y a aucune précipitation mais le taux d'autolyse est extrêmement faible.

2 - Effet de la température.

Nous avons effectué des autolyses des parois de B. subtilis cbl-1, dans le même tampon, mais à différentes températures. D'après la loi d'ARRHENIUS, nous avons porté le logarithme de la constante de vitesse de la deuxième phase d'autolyse, en fonction de l'inverse de la température absolue. La courbe obtenue (cf. figure 32) présente une rupture de pente à t = 31° C.

3 - Effet de la force ionique.

Lors de l'étude de l'autolyse des parois de B. subtilis cbl-1 à pH 6,6, en faisant varier la concentration en ions K^+ du milieu, nous observons que la vitesse n'est pas très sensible à la variation de la force ionique du milieu (cf. figure 33).

4 - Effet de la pénicilline G.

L'autolyse des parois en présence de pénicilline G (15 µl. C = 20 µg/ml) reste inchangé. La pénicilline n'inhibe donc pas le système autolytique de B. subtilis cbl-1. LAWRENCE et STROMINGER (82, 83) ont montré que les D-D-carboxypeptidases présentes dans les membranes de B. subtilis étaient spécifiquement inhibées par la pénicilline G. Par la même technique, nous avons dosé ces activités enzymatiques dans les membranes de B. subtilis cbl-1, nous avons montré leur existence, mais aussi qu'elles étaient inhibées spécifiquement par la pénicilline G.

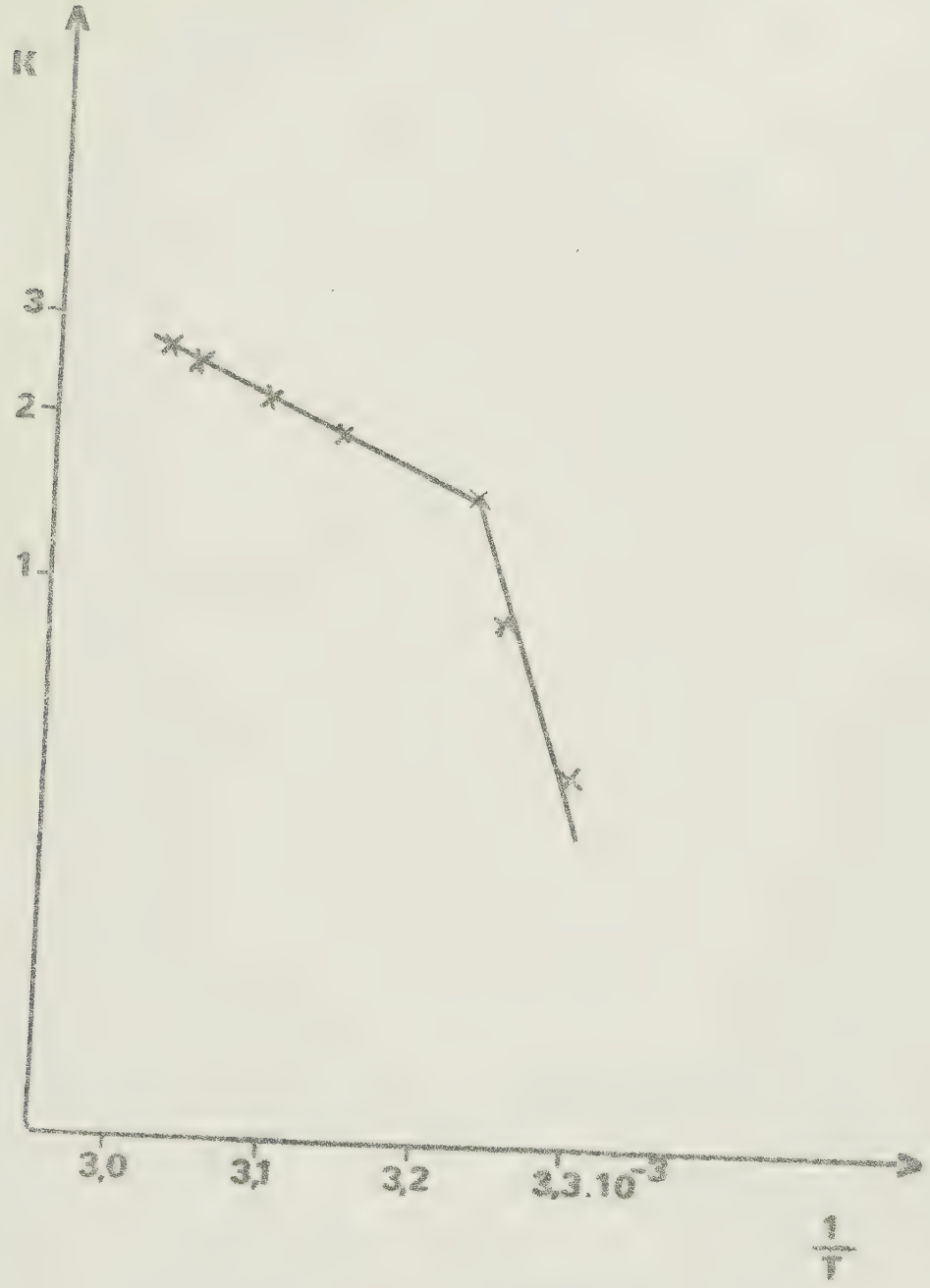


FIGURE 32

EFFET DE LA TEMPERATURE SUR L'AUTOLYSE A pH 6,6 DES PAROIS DE *B. subtilis* cbl-1

Les parois sont mises en suspension (2 mg/ml) dans du tampon acétate d'ammonium 0,05 M pH 6,6 puis incubées à différentes températures. La constante de vitesse de la phase principale de l'autolyse est portée en fonction de l'inverse de la température absolue.

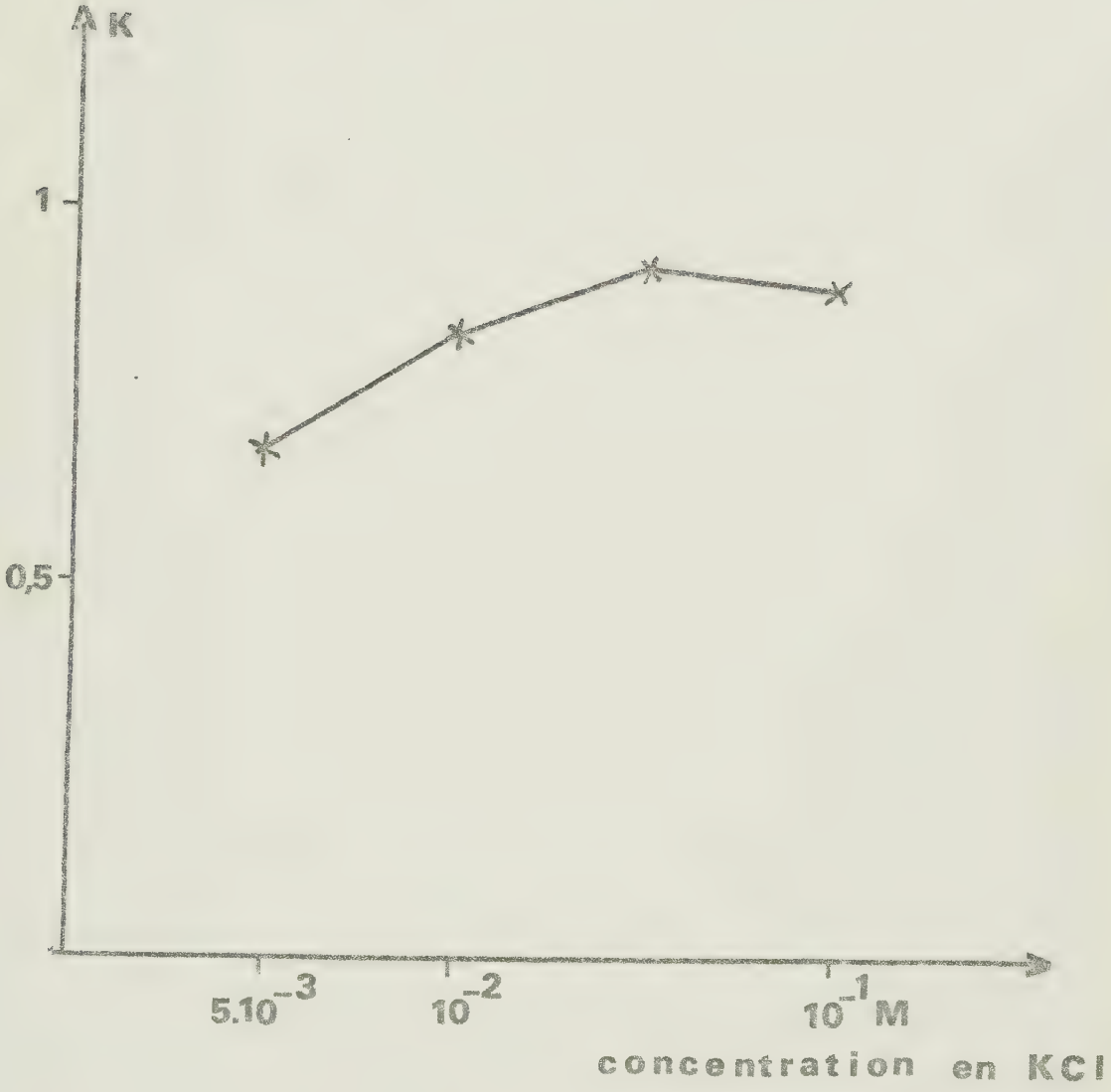


FIGURE 33

EFFET DE LA FORCE IONIQUE SUR L'AUTOLYSE A pH 6,6 DES PAROIS DE *B. subtilis* cbl-1

Les parois sont mises en suspension (2 mg/ml) dans du tampon acétate d'ammonium 0,05 M pH 6,6 auquel on ajoute des concentrations variables de KCl, puis incubées à 37° C. La constante de vitesse de la phase principale de l'autolyse est portée en fonction des différentes concentrations de KCl.

Résumé

Le système autolytique de B. subtilis cbl-1 est composé d'une N-acétylmuramidase et d'une N-acétylmuramyl-L-alanine amidase. Cette dernière activité semble sous contrôle. L'autolyse des parois est maximale à pH 6, 6, augmente avec la température mais n'est sensible ni à la variation de force ionique du milieu, ni à l'addition de pénicilline.

DISCUSSION

Dans le travail que nous venons de présenter, nous avons mis en évidence et étudié un nouveau type de paroi bactérienne, la paroi de B. subtilis cbl-1. Par certains aspects, la paroi de cette souche a une structure comparable à celle d'une bactérie gram-négative. En effet, elle est composée d'un peptidoglycane qui ne représente que 9 % de la paroi, dont l'épaisseur est faible et qui est isolable comme celui de E. coli (13). La ressemblance est accentuée, d'une part, par l'absence d'acide téïchoïque, en particulier d'acide téïchoïque membranaire qui caractérise les enveloppes des bactéries gram-positives (4), d'autre part, par la présence d'une forte teneur en protéine. Cependant, contrairement aux bactéries gram-négatives cette paroi ne contient qu'un taux faible de lipides (3%) et est totalement dépourvue de phospholipides et de lipopolysaccharides. Or, le test de GRAM nous a confirmé qu'il s'agissait bien d'une bactérie gram-positive. Dans ce test, la différence de coloration des parois provient de leur différence de perméabilité à l'éthanol qui décolore le complexe violet de gentiane-iode. Le fait que ce test soit positif avec B. subtilis cbl-1, montre que les protéines pariétales n'interviennent pas dans cette perméabilité mais que seuls les lipides doivent en être responsables (112).

La protéine cbl-1

La paroi de B. subtilis cbl-1 est composée pour sa majeure partie par la protéine cbl-1, de haut poids moléculaire (255.000 daltons) qui forme deux couches, situées de part et d'autre d'un peptidoglycane de faible épaisseur. Dans cette étude, nous avons mis en évidence une organisation des polymères de la paroi, originale et jamais observée auparavant. Dans les quelques cas où le problème de la localisation des

protéines a été abordé, celles-ci ont été localisées à la face externe du peptidoglycane, comme par exemple chez B. polymyxa (95) et B. sphaericus (67). Nous retrouvons encore une telle situation chez E. coli puisque les protéines de la paroi sont situées dans la membrane externe, sous forme libre, ou liées covalentiellement au peptidoglycane sous-jacent (112).

Les protéines des parois de B. polymyxa et B. sphaericus (54) forment des arrangements tétragonaux qui ont pu être mis en évidence au microscope électronique, par la technique d'ombrage. Chez E. coli, ROSENBUSCH (104) a montré que les molécules d'une des protéines de la membrane externe formaient une disposition géométrique. Pour les molécules de protéine cbl-1 une structure régulière a été également mis en évidence (figure 34).

Mais, quelque soit l'arrangement de ces protéines pariétales, il convient de préciser le mode de liaison des protéines entre elles, ainsi qu'avec les autres polymères de la paroi. Dans les parois de B. polymyxa (95), B. sphaericus (67) et B. psychrophilus (2) les associations protéine-protéine et protéine-peptidoglycane sont de type non covalent. Dans la paroi du mutant B. subtilis cbl-1, nous avons mis en évidence une situation analogue. En effet, après traitement de la paroi B. subtilis cbl-1 par le dodécylsulfate de sodium ou par le chlorure de lithium, nous avons obtenu un peptidoglycane complètement dépourvu de protéines, ce qui démontre que seules des liaisons non covalentes interviennent dans l'association entre ces macromolécules et que, de plus, nous avons une situation différente de celles des parois de S. aureus (123), des streptocoques du groupe A (81) et de E. coli (10) où des protéines sont liées covalentiellement au peptidoglycane.

Jusqu'à présent, seule la biosynthèse de la protéine pariétale A de S. aureus a été étudiée (94). Il a été démontré que cette protéine, une fois synthétisée, est directement transportée (sans passer par une forme soluble dans le cytoplasme) et se lie (probablement par transpeptidation) au

Figure - 34 -

peptidoglycane déjà synthétisé. La protéine cbl-1 représente 13% des protéines totales de la cellule et sa biosynthèse doit sûrement demander une quantité importante d'ARN-messager à demi-vie courte ou un ARN messager très stable. La biosynthèse de cette protéine cbl-1 ainsi que son mode de transport à travers la membrane cytoplasmique reste un problème à résoudre. Chez E. coli, HIRASHIMA et coll. (65) ont abordé le problème de la biosynthèse des protéines de l'enveloppe, en étudiant les effets inhibiteurs des différents antibiotiques. Les résultats obtenus montrent que quelques unes des protéines de l'enveloppe doivent avoir leur propre système de biosynthèse et que les ARN-messagers de ces protéines sont beaucoup plus stables que ceux des protéines cytoplasmiques.

Le problème des acides téïchoïques.

La présence de la protéine cbl-1 n'est pas la seule caractéristique de cette paroi. En effet, il y a une déficience complète en acides téïchoïques. Ces acides téïchoïques ont de par leur caractère anionique un rôle biologique important pour les bactéries gram-positives (4). Leur fonction principale serait de fixer des cations divalents (surtout ceux du magnésium) afin de maintenir une forte concentration ionique nécessaire à un certain nombre de biosynthèses de macromolécules aussi bien pariétales qu'intracellulaires (4). Ces polymères n'existent pas dans toutes les parois des bactéries gram-positives, mais ils sont alors généralement remplacés par des polysaccharides anioniques qui doivent avoir la même fonction (103). Dans certains cas et pour une même souche (B. subtilis niger par exemple), ce remplacement peut se faire par simple modification des conditions du milieu de culture (37, 103). Par ailleurs, la difficulté d'isoler des mutants dont les parois sont totalement dépourvues d'acide téïchoïque, révèle le caractère indispensable de ces macromolécules (9, 42, 53, 120, 143). Si par mutation il y a carence en polymère anionique comme chez Micrococcus luteus (148), les bactéries ne renfermant alors que du peptidoglycane, ont une exigence pour les cations divalents. Mais quelque

soit la modification au niveau des acides téïchoïques, il a toujours été trouvé jusqu'à présent chez les bactéries gram-positives un acide téïchoïque membranaire (4, 103).

Pour B. subtilis cbl-1, il reste à savoir qui va jouer le rôle de ces polymères sur le plan physiologique. Il se pourrait que chez cette souche, leur rôle soit rempli par la protéine cbl-1. En effet, cette protéine est anionique (point isoélectrique à pH 4, 2), et de plus, elle est localisée de part et d'autre du peptidoglycane. Donc, nous pouvons admettre que, d'une part, la fraction de protéine cbl-1, située dans la zone périplasmique entre le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique, remplacerait les acides téïchoïques membranaires (figure 4b) et d'autre part, les molécules de protéines situées à la face externe joueraient le rôle d'acide téïchoïque pariétal. Pour étayer cette hypothèse, nous avons étudié l'affinité de cette protéine cbl-1 pour les cations divalents et notamment pour l'ion magnésium. La valeur obtenue (30 équiv-gr/mole protéine cbl-1) est importante et montre bien que cette protéine est capable de fixer une grande quantité d'ions divalents. L'étude de B. subtilis cbl-1 révèle donc que les acides téïchoïques peuvent être substitués dans leur fonction par deux couches de protéine anionique. C'est la première fois qu'une telle situation est observée. Par ailleurs, la présence de la charge négative de la protéine cbl-1, comme celle des acides téïchoïques pariétaux, pourrait servir, par répulsion de charge, à disperser la population bactérienne dans le milieu de culture et ainsi permettre aux bactéries une meilleure nutrition (4, 148).

Peptidoglycane et polymère de galactosamine

La structure globale du peptidoglycane de B. subtilis a été établie chez deux souches, B. subtilis Porton et B. subtilis 168 et s'est révélé être identique pour les deux (141, 134). A l'aide de ces résultats, nous avons étudié le peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 et avons trouvé qu'il est quatre

fois moins important que les deux précédents, mais qu'il a la même structure globale et le même degré de pontage. Comme nous l'avons déjà mentionné, ce peptidoglycane, par son épaisseur, fait penser à celui d'une bactérie gram-négative dans laquelle il est protégé du milieu environnant par la membrane externe (96). Chez B. subtilis cbl-1 cette macromolécule est recouverte par les molécules de protéine cbl-1. En comparant ces deux situations, on peut penser que l'existence d'un peptidoglycane mince n'est compatible qu'avec une telle protection.

Au peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 est lié par une liaison covalente stable un polymère de galactosamine et glucosamine qui ne représente que 5% du poids de la paroi et qui ressemble à celui que DUCKWORTH et coll. (33) ont isolé à partir de la paroi de B. subtilis 168.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail, d'une part par microscopie électronique, d'autre part par l'étude des polymères qui la composent, conduit à la structure schématisée dans la figure 35 et dans laquelle le peptidoglycane serait pris entre deux couches identiques formées par l'ensemble des molécules de protéines cbl-1 et des chaînes de polymère de galactosamine et de glucosamine.

Les enzymes autolytiques.

Le système autolytique de B. subtilis cbl-1 est composé principalement d'une N-acétylmuramidase et d'une N-acétylmuramyl-L-alanine amidase. Pendant l'autolyse spontanée des parois dont la vitesse est lente, seule l'activité glycosidasique semble intervenir. Afin de mettre en évidence l'amidase qui est sous une forme cryptique, nous avons dû faire subir aux parois un traitement drastique pour induire une dégradation autolytique du peptidoglycane avec rupture des liaisons N-acétylmuramyl-L-alanine. Le contrôle strict de cette activité hydrolytique et la faible vitesse d'autolyse des parois sont peut être caractéristiques de bactéries présentant un peptidoglycane de faible épaisseur. En effet,chez E. coli le système

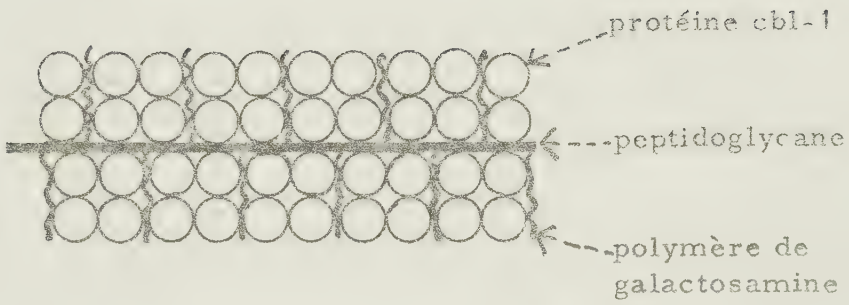


Figure 35

Structure que doit avoir la paroi de B. subtlis cbl-1
d'après les résultats obtenus dans ce travail.

autolytique est sous un contrôle strict puisque l'autolyse spontanée des enveloppes ne peut être déclenchée qu'après des traitements particuliers (93, 59). Au cours de la croissance et de la division cellulaire, les autolysines interviennent dans le remaniement et le renouvellement du peptidoglycane. Chez les souches W23 et 168 de B. subtilis, il a été observé que la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase joue un rôle important dans le renouvellement du peptidoglycane qui, dans ces souches, constitue avec les autres macromolécules pariétales une structure relativement épaisse (37, 103). Au contraire, chez E. coli il n'y a aucun renouvellement du peptidoglycane mais seulement des remaniements (107). Il conviendrait donc d'établir si une situation analogue existe chez cbl-1.

Relations entre les souches B. subtilis cbl-1 et B. subtilis 168 wt.

La souche B. subtilis cbl-1, isolée à partir de cultures de spores de B. subtilis 168 wt peut être considérée soit comme le résultat d'une mutation spontanée de cette souche soit comme une bactérie étrangère. L'hypothèse d'une mutation a déjà été en partie étayée par les travaux de SZULMAJSTER et coll. (124). Par transformation, l'acide désoxyribonucléique de B. subtilis cbl-1 transfère le phénotype thy à la souche auxotrophe B. subtilis thy^- trp^-. D'autre part, deux caractères Pha_1^r et $his\ A_1$ de B. subtilis cbl-1 peuvent être transférés à différentes souches de B. subtilis par transduction au moyen du phage PBS-$_1$. Le pourcentage de co-transfert du gène Pha^r, qui est étroitement lié au gène $his\ A_1$, est le même pour toutes ces souches. B. subtilis 168 wt et B. subtilis cbl-1 ont le même contenu en bases G + C, 43%, caractéristique de B. subtilis. Bien qu'encore fragmentaires, l'ensemble de ces résultats laisse entrevoir qu'on pourrait être en présence d'un véritable mutant de B. subtilis 168 wt. Néanmoins, des expériences génétiques ultérieures devront être faites pour confirmer ou infirmer ces données.

Les relations entre B. subtilis cbl-1 et B. subtilis 168 ont un caractère très particulier du fait que B. subtilis cbl-1 excrète une substance qui tue, semble-t-il, assez spécifiquement B. subtilis 168. En effet, quand les deux souches sont cultivées ensemble sur bouillon nutritif, les cellules de B. subtilis 168 wt meurent. Les spores obtenues à partir d'une telle culture sont toutes de type cbl-1. La nature de cette toxine (la protéine cbl-1 n'a aucune activité toxique) et son action semblent être spécifiques à B. subtilis puisqu'elle n'a aucun effet sur des bactéries telles que Bacillus cereus, B. licheniformis ou E. coli récoltés en fin de phase exponentielle. Toutefois, il n'a pas été déterminée si cette spécificité est limitée ou non à la souche B. subtilis 168. Que B. subtilis cbl-1 soit ou non le résultat d'une mutation spontanée de B. subtilis 168 wt, l'existence de cette toxine peut expliquer la sélection qui s'est effectuée sur géiose et qui a permis de la mettre en évidence.

Si nous admettons que B. subtilis cbl-1 provient d'une mutation spontanée de B. subtilis 168 wt, les effets de cette mutation sont multiples et nous sommes confrontés avec un large pléiotropisme. A la lumière de cette éventualité, il convient donc de discuter un certain nombre des résultats que nous avons obtenus dans ce travail. Les études morphologiques et biochimiques que nous avons faites ne nous permettent pas d'expliquer la cause primaire de cette mutation c'est-à-dire la dérépression de la biosynthèse de la protéine cbl-1 et la répression de la biosynthèse des polymères à base de phosphate. L'apparition de la protéine cbl-1 constitue le fait majeur dans la structure de la paroi de B. subtilis cbl-1. Mais, par études immunochimiques nous n'avons retrouvé cette protéine ni dans la paroi de B. subtilis 168 wt ni dans l'extrait bactérien. Il se peut que cette protéine existe dans cette souche mais en quantité telle qu'elle ne soit pas détectable par cette méthode ou bien qu'elle y soit complétement réprimée.

Par ailleurs, la mutation aurait fait disparaître aussi bien l'acide téichoïque pariétal que l'acide téichoïque membranaire : cela montrerait que, soit ces deux polymères sont sous le même contrôle génétique, soit la biosynthèse d'acide téichoïque pariétal est dépendante de la présence d'acide téichoïque membranaire.

Chez B. subtilis 168 l'activité autolytique principale est une N-acétyl-muramyl-L-alanine amidase (145, 146) qui nécessite la présence d'acides téïchoïques glycosylés pour agir (143, 63, 43). Cet enzyme serait associé à ces polymères (19, 40). Récemment, HERBOLD et GLASER (63), qui ont purifié cette activité enzymatique, ont montré que les acides téïchoïques joueraient le rôle de ligand allostérique responsable de la liaison entre l'enzyme et la paroi. Or la mutation, chez B. subtilis cbl-1 aurait entraîné la disparition de ces polymères, ce qui expliquerait peut être le caractère cryptique que nous avons constaté pour cet enzyme. Ce phénomène a déjà été observé chez d'autres bactéries. En effet, les parois de mutants de S. aureus (120) et de B. subtilis (9) ne possédant pas d'acide téïchoïque, s'autolysent avec des vitesses très réduites ou pas du tout. D'autre part, FORSBERG et ROGERS ont trouvé chez des mutants de B. licheniformis que la perte d'activité amidasique était liée à la perte de glucose de l'acide téïchoïque (42).

Chez B. subtilis cbl-1 à côté de la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase on trouve une N-acétylmuramidase associée à la paroi et non une N-acétylglucosaminidase comme dans la paroi de B. subtilis 168 (132). Ce changement de spécificité de la glycosidase pariétale ne semble pas, pour l'instant, pouvoir s'expliquer par le phénomène de mutation.

Les résultats obtenus pour le peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 sont compatibles avec l'hypothèse d'une mutation, puisqu'ils sont comparables à ceux décrits pour les peptidoglycanes de B. subtilis Porton et B. subtilis 168 (68, 70, 134, 141). En outre, dans les souches B. subtilis cbl-1 et B. subtilis 168 nous retrouvons le même polysaccharide à base de galactosamine et de glucosamine lié covalentiellement au peptidoglycane par une liaison résistante à l'hydrolyse acide et alcaline ménagée. Toutefois, le peptidoglycane isolé de B.subtilis cbl-1 est de très faible épaisseur. Dans l'hypothèse d'une mutation, ce fait pourrait s'expliquer par la disparition des polymères pariétaux à base de phosphate, normalement liés au peptidoglycane chez B. subtilis 168. En effet, la paroi de B. subtilis cbl-1 ne contient aucun de

ces polymères mais seulement le polymère de galactosamine et de glucosamine en quantité équivalente à celle de la souche B. subtilis 168. Nous sommes alors conduits à admettre que, par l'effet de la mutation, seule la partie de peptidoglycane résiduelle attachée au polymère de galactosamine et glucosamine subsisterait. Cette conclusion suggérerait que chez B. subtilis 168 à chaque polysaccharide pariétal correspondrait spécifiquement une fraction déterminée de peptidoglycane, la biosynthèse de ces deux polymères étant coordonnée.

Conclusion

L'intérêt de l'étude de B. subtilis cbl-1 tient, d'une part, à son origine et à son éventuelle filiation à B. subtilis 168, d'autre part, à la structure très particulière de sa paroi. Les résultats morphologiques et biochimiques que nous avons acquis ont contribué à mettre en évidence l'originalité d'une paroi d'un type nouveau, mais n'ont pas permis de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse de la mutation. Toutefois, en raison même de leur importance, la nécessité de les compléter par une analyse génétique plus approfondie de la souche cbl-1 prend un caractère prioritaire avant tout développement complémentaire des travaux biochimiques.

Au cas où cette analyse ultérieure confirmerait l'hypothèse d'une mutation spontanée, il restera à expliquer les effets dominants du pleïotropisme observé. Si au contraire, cbl-1 s'avèrerait ne pas être le résultat d'une mutation, il n'en reste pas moins que sa paroi présente un type de structure qui se distingue nettement de celles décrites jusqu'alors et qui la place entre les parois des bactéries gram-positives et des bactéries gram-négatives.

Enfin, quelque soit l'origine de la souche cbl-1, la spécificité de la toxine qu'elle excrète et son mode d'action sur B. subtilis 168 demeure un problème à résoudre.

BIBLIOGRAPHIE

1 - AKRIGG, A. et AYAD, S.R., Biochem. J. 117, (1970) 397-405.

2 - ALSOBROOK, D., LARKIN, J.M. et SEGA, M.W., Can. J. Microbiol. 18 (1972) 1671-1678.

3 - ARCHIBALD, A.R. et BADDILEY, J., Advances Carbohydrates Chem. 21 (1966) 323-375.

4 - BADDILEY, J., Essays in Biochemistry, Ed. by CAMPBELL, P.N. et DICKENS, F. Academic Press - Londres 8 (1975) 35-77.

5 - BEST, G.K. et MATTINGLY, S.J., J. Bacteriol. 115 (1973) 221-227.

6 - BIRDSELL, D.C., DOYLE, R.J. et MORGENSTERN, M., J. Bacteriol. 121 (1975) 726-734.

7 - BOLLE, A. et KELLENBERGER, E., Schweiz. Z.Allgem.Pathol.Bakteriol. 21 (1958) 714.

8 - BOSCH, V. et BRAUN, V., FEBS Lett. 34 (1973) 307-310.

9 - BOYLAN, R.J., MENDELSON, N.H., BROOKS, D. et YOUNG, F.E., J. Bacteriol. 110 (1972) 281-290.

10 - BRAGG, P.D. et HOU, C., FEBS Lett., 15 (1971) 142-144.

11 - BRAGG, P.D. et HOU, C., Biochim.Biophys. Acta, 274 (1972) 478-488.

12 - BRAUN, V. et BOSCH, V., Proc. Nat.Acad. Sci. U.S.A. 69 (1972) 970-974.

13 - BRAUN, V. et REHN, K., Eur. J. Biochem. 10 (1969) 426-438.

14 - BRAUN, V., SCHALLER, K. et WOLFF, H., Biochim. Biophys. Acta 323 (1973) 87-97.

15 - BRAUN, V. et SIEGLIN, U. Eur. J. Biochem. 13 (1970) 336-346.

16 - BRAUN, V. et WOLFF, H. Eur. J. Biochem. 14 (1970) 387-391.

17 - BRILES, E.B. et TOMASZ, A., J. Bacteriol. 122 (1975) 335-337.

18 - BRINTON, C.C., Mac NARY, J.C. et CARNAHAN, J., Bacteriol. Proc. (1969) 48.

19 - BROWN, W.C., FRASER, D.K. et YOUNG, F.E., Biochim. Biophys. Acta, 198 (1970) 308-315.

20 - BROWN, W.C. et YOUNG, F.E., Biochem. Biophys. Res. Commun. 38 (1970) 564-568.

21 - BURGER, M.M. et GLASER, R.L., J. Biol. Chem. 241 (1966)494-605.

22 - Mc CARTHY, M. et MORSE, S.I., Adv. Immun. 4 (1964) 249-286.

23 - CHATTERJEE, A.N. et YOUNG, F.E., J. Bacteriol. 111 (1972) 220-230.

24 - CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y. et WAGNER, H., Anal. Chem. 28 (1956) 1756-1758.

25 - CHRAMBACH, A., REISFELD, R.A., WICKOFF, M. et ZACCARL, J. Anal. Biochem. 20 (1967) 150-154.

26 - COLEY, J., DUCKWORTH, M. et BADDILEY, J., J. Gen. Microbiol. 73 (1972) 587-591.

27 - Cours de l'INSTITUT PASTEUR "Bactéries - Bactériophages" Ediscience/Mc GRAW-HILL (1974) Paris.

28 - DANKERT, M., WRIGHT, A., KELLEY, W.S. et ROBBINS, P.W. Arch. Biochem. Biophys. 116 (1966) 425-435.

29 - DE SIERVO, A.J., J. Bacteriol. 100 (1969) 1342-1349.

30 - DISCHE, Z., J. Biol. Chem. 167 (1947) 189-198.

31 - DOYLE, R.J., Mc DANNEL, M.L., HELMAN, J.R. et STREIPS, U.N. J. Bacteriol. 122 (1975) 152-158.

32 - DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. et SMITH, F., Anal. Chem. 28 (1956) 350-358.

33 - DUCKWORTH, M., ARCHIBALD, A.R. et BADDILEY, J., Biochem. J. 130 (1972) 691-696.

34 - DUCKWORTH, M., ARCHIBALD, A.R. et BADDILEY, J., FEBS Lett. 53 (1975) 176-179.

35 - DUL, M.J. et YOUNG, F.E., J. Bacteriol. 115 (1973) 1212-1214.

36 - ELLMAN, G.L., Arch. Biochem. Biophys. 82 (1959) 70-77.

37 - ELLWOOD, D.C., Biochem. J., 118 (1970) 367-373.

38 - FAN, D.P., J. Bacteriol. 103 (1970) 488-493.

39 - FAN, D.P. et BECKMAN, M.M., J. Bacteriol. 105 (1971) 629-636.

40 - FAN, D.P. et BECKMAN, M.M., J. Bacteriol. 109 (1972) 1258-1265.

41 - FAN, D.P., BECKMAN, M.M. et CUNNINGHAM, W.P., J. Bacteriol. 109 (1972) 1247-1257.

42 - FORSBERG, C.W. et ROGERS, H.J., Nature, 229 (1971) 272-273.

43 - FORSBERG, C.W. et ROGERS, H.J., J. Bacteriol. 118 (1974) 358-368.

44 - FORSBERG, C.W., WYRICK, P.B., WARD, J.B. et ROGERS, H.J., J. Bacteriol. 113 (1973) 969-984.

45 - FORSGREN, A., Infec. Immun. 2 (1970) 672-673.

46 - FOX, E.N. et WITTNER, M.K., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 54 (1965) 1118-1125.

47 - FREER, J.H. et SALTON, M.R.J., in "Microbiol Toxins" (G. WEINBAVM, KADIS, S. et AJL, S.J. eds) 4 (1970) 67-126. Academic Press New-York.

48 - GARTEN, W. et HENNING, U., Eur. J. Biochem. 47 (1974) 343-352.

49 - GHUYSEN, J.M., Bacteriol. Rev. 32 (1968) 425-464.

50 - GHUYSEN, J.M., TIPPER, D.J., et STROMINGER, J.L., Methods in Enzymology, 8 (1966) 685-699.

51 - GLASER, L., Annual Review of Biochemistry, (1973) 91-112.

52 - GLASER, L., IONESCO, H. et SCHAEFFER, P., Biochim. Biophys. Acta, 124 (1966) 415-417.

53 - GLASER, L. et LINDSAY, B., Biochem. Biophys. Res. Commun. 59 (1974) 1131-1136.

54 - GLAUERT, A.M. et THORNLEY, M.J., Ann. Rev. Microbiol., 23 (1969) 159-198.

55 - GOOD, C.M. et TIPPER, D.J., J. Bacteriol. 111 (1972) 231-241.

56 - GOUNDRY, J., DAVISON, A.L., ARCHIBALD, A.R. et BADDILEY, J. Biochem. J. 104 (1967) 1c-2c.

57 - HAHN, J.J. et COLE, R.M., J. Expl. Med. 118 (1963) 659-666.

58 - HARA, S. et MATSUSHIMA, Y., Bull. Soc. Chem. Japan, 39 (1966) 1826.

59 - HARTMAN, R., BOCK-HENNIG, J.B. et SCHWARZ, U., Eur. J. Biochem. 41 (1971) 203-208.

60 - HEDRICK, J.L. et SMITH, A.J., Arch. Biochem. Biophys. 126 (1968) 155-164.

61 - HENNING, U., HOHN, B. et SONNTAG, I., Eur. J. Biochem. 39 (1973) 27-36.

62 - HENNING, U., REHN, K. et HOEHN, B., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70 (1973) 2033-2036.

63 - HERBOLD, D.R. et GLASER, L., J. Biol. Chem. 250 (1975) 1676-1682.

64 - HIRASHIMA, A., WU, H.C., VENKATESWARAN, P.S. et INOUYE, M., J. Biol. Chem. 248 (1973) 5654-5659.

65 - HIRASHIMA, A., CHILDS, G. et INOUYE, M., J. Mol. Biol. 79 (1973) 373-389.

66 - HOLT, S.C. et LEADBETTER, E.R., Bacteriol. Rev., 33 (1969) 346-378.

67 - HOWARD, L. et TIPPER, D.J., J. Bacteriol. 113 (1973) 1491-1504.

68 - HUGHES, R.C., Biochem. J., 119 (1970) 849-860.

69 - HUGHES, A.H., HANCOCK, J.C. et BADDILEY, J., Biochem. J. 132 (1973) 81-93.

70 - HUGHES, R.C., PAVLIK, J.G., ROGERS, H.J. et TANNER, P.J., Nature, 219 (1968) 642-644.

71 - HUGHES, R.C. et TANNER, P.J., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33 (1968) 22-28.

72 - HUGHES, R.C. et THURMAN, P.F., Biochem. J. 119 (1970) 925-926.

73 - INOUYE, M., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71 (1973) 2396-2400.

74 - INOUYE, M., SHAW, J. et SHEN, C., J. Biol. Chem. 247 (1972) 8154-8159.

75 - JARVIS, D. et STROMINGER, J.L., Biochem. J., 6 (1967) 2591-2598.

76 - JUSIC, D., ROY, C., SCHOCHER, A.J. et WATSON, R.W., Can. J. of chemistry, 41 (1963) 2715-2718.

77 - KAUFMAN, W.J., NIR, A., PARKS, G. et HOURS, R.M. Recent Advances in low level scintillation couting of tritium, Symposium on the use of the tritium in the physical and biological sciences. (I.A.E.A., Vienna 1962 p. 249).

78 - KELEMEN, M.V. et ROGERS, H.J., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68 (1971) 992-996.

79 - KERJAN, P. et SJULMAJSTER, J., C.R. Acad. Sci. Paris, 262 (1966) 312-315.

80 - KONINGS, W.N., BISSCHOP, A., VEENHUIS, M. et VERMEULEN, C.A., J. Bacteriol. 116 (1973) 1456-1465.

81 - LANGE, C.F., LEE, R. et MERDINGER, E., J. Bacteriol. 100 (1969) 1277-1283.

82 - LAWRENCE, P.J. et STROMINGER, J.L., J. Biol. Chem. 245 (1970) 3653-3659.

83 - LAWRENCE, P.J. et STROMINGER, J.L., J. Biol. Chem. 245 (1970) 3660-3666.

84 - LEADBETTER, E.R. et HOLT, S.C., J. Gen. Microbiol. 52 (1968) 299-307.

85 - LEIVE, L. "Bacterial Membranes and Walls" Marcel Dekker, Inc. New-York (1973).

86 - LOWRY, D.H., résultats non publiés.

87 - LOWRY, D.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J., J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-275.

88 - MATTINGLY, J. et BEST, G.K., J. Bacteriol. 109 (1972) 645-651.

89 - MAUCK, J., CHAN, L. et GLASER, L., J. Biol. Chem. 246 (1971) 1820-1827.

90 - MAUCK, J. et GLASER, L., J. Biol. Chem. 247 (1972) 1180-1187

91 - MIURA, T. et MIZUSHIMA, S., Biochim. Biophys. Acta, 150 (1968) 159-161.

92 - MIURA, T. et MIZUSHIMA, S., Biochim. Biophys. Acta, 193 (1969) 268-276.

93 - MOHAN, R.R., KRONISH, D.P., PIANOTTI, R.S., EPSTEIN, R.L. et SCHWARTZ, B.S., J. Bacteriol. 90 (1965) 1355-1364.

94 - MOVITZ, J., Eur. J. Biochem. 48 (1974) 131-136.

95 - NERMUT, M.V. et MURRAY, R.G.E., J. Bacteriol. 93 (1967) 1949-1965.

96 - NIKAIDO, H., in "Bacterial walls and membranes" Marcel Dekker Inc. New-York, (1973) 131-208.

97 - OSBORN, M.J., GANDER, J.E., PARISI, E. et CARSON, J., J. Biol. Chem. 247 (1972) 3962-3972.

98 - PARK, J.T. et JOHNSON, M.J., J. Biol. Chem. 181 (1949) 149-151.

99 - RAMBOURG, A., C.R.Acad. Sci. Paris, 265 (1967) 1426-1428.

100 - RHULAND, L.E., WORK, E., DENNAM, A.F. et HOARED, S., J. Amer. Chem. Soc. 77 (1955) 4844-4846.

100a- RICHMOND M.H. Biochim. Biophys. Acta 33 (1959) 92-101.

101 - ROGERS, D., Biochim. Biophys. Acta, 230 (1971) 72-81.

102 - ROGERS, H.J. et PERKINS, H.R. "Cell walls and membranes" E. et F.N. SPON L.T.D., Londres (1968).

103 - ROSE, A.H. et TEMPEST, D.W. "Advances in Microbiol Physiology" Academic Press, Londres, 7 (1972).

104 - ROSENBUSCH, J.P., J. Biol. Chem. 249 (1974) 8019-8029.

105 - ROTHFIELD, L., OSBORN, M.J. et HORECKER, B.L., J. Biol. Chem. 239 (1964) 2788-2795.

106 - ROTHFIELD, L. et PEARLMAN-KOTENCZ, J. Mol. Biol. 44 (1969) 477-492.

107 - RYTER, A., HIROTA, Y. et SCHWARZ, U., J. Mol. Biol. 78 (1973) 185-195.

108 - RYTER, A. et KELLENBERGER, E., Z. Naturforsch. 13b (1958) 597.

109 - SABET, S.F. et SCHNAITMAN, C.A., J. Biol. Chem. 248 (1973) 1797-1806.

110 - SALTON, M.R.J., Biochem. Biophys. Acta, 10 (1953) 512-523.

111 - SALTON, M.R.J. et MARSHALL, B., J. Gen. Microbiol. 21 (1959) 415-420.

112 - SALTON, M.R.J., "The Bacterial cell wall" Elsevier publishing company, Naw-York (1964).

113 - SALTON, M.R.J., Ann, Rev. Microbiol. 21 (1967) 417-466.

114 - SCANDELLA, C.J. et KORRBGER, G., Biochemistry, 10 (1971) 4447-4456.

115 - SCHLEIFER, K.H. et KANDLER, O., Bacteriol. Rev. 36 (1972) 407-477.

116 - SCHNAITMAN, C.A., J. Bacteriol. 108 (1971) 553-563.

117 - SCHNAITMAN, C.A., Arch. Biochem. Biophys. 157 (1973) 541-552.

118 - SCHNAITMAN, C.A., J. Bacteriol. 118 (1974) 442-453.

119 - SHARON, N., FLOWERS, H.M. et JEANLOZ , R.W., J. Biol. Chem. 241 (1966) 223-230.

120 - SHAW, D.R.D., MIRELMAN, D., CHATTERJEE, A.N. et PARK, J.T., J. Biol. Chem. 245 (1970) 5101-5106.

121 - SHOCKMAN, G.D. et CHENEY, M.C., J. Bacteriol. 98 (1969) 1199-1207.

122 - SJOHOLM, I., Eur. J. Biochem. 51 (1975) 55-61.

123 - SJOQUIST, J., JOHANSSON, I-B., MOVITZ, J. et HJELM, H. Eur. J. Biochem. 30 (1972) 190-194.

124 - SZULMAJSTER, J., ARNAUD, M. et YOUNG, F.E., J. Gen. Microbiol., 57 (1969) 1-10.

125 - SZULMAJSTER, J., MARCHETTI, J. et ARNOTT, J., Résultats non publiés.

126 - STEWART, C.R. et MARMUR, J., J. Bacteriol. 101 (1970) 449-455.

127 - THIERY, J.M., J. Microscopie 6 (1967) 987-1018.

128 - THOMPSON, J.S. et SHOCKMAN, G.D., Anal. Biochem. 22 (1968) 260-268.

129 - TIPPER, D.J. et STROMINGER, J.L., J. Biol. Chem. 243 (1968) 3169-3179.

130 - Van HEIJENOORT, J., MENJON, D., FLOURET, B., SJULMAJSTER, J., LAPORTE, J. et BATELIER, G., Eur. J. Biochem. 20 (1971) 442-450.

131 - Van TUBERGEN, R.P. et SETLOW, R.B., Biophys. J. 1 (1961) 589-625.

132 - WARD, J.B., Biochem. J., 133 (1973) 395-398.

133 - WARD, J.B. et PERKINS, H.R., Biochem. J., 135 (1973) 721-728.

134 - WARTH, A.D. et STROMINGER, J.L., Biochemistry, 10 (1971) 4349-4358.

135 - WEBER, K., PRINGLE, J.R. et OSBORN, M., Methods in Enzymology, 26 (1972) 3-27.

136 - WICKEN, A.J. et KNOX, K.W., Science 187 (1975) 1161-1167.

137 - WISE, E.M., GLICKMAN, R.S. et TEIMER, E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69 (1972) 233-237.

138 - WOLF-WATZ, H., NORMARK, S. et BLOOM, G.D., J. Bacteriol. 115 (1973) 1191-1197.

139 - WORK, E., KNOX, K.W. et VESK, M. Ann. N.Y. Acad. Sci. 133 (1966) 438.

140 - WU, M.C. et HEATH, E.C., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70 (1973) 2572-2576.

141 - YOUNG, F.E., J. Bacteriol. 92 (1966) 839-846.

142 - YOUNG, F.E., J. Biol. Chem. 241 (1966) 3462-3467.

143 - YOUNG, F.E., Proc. Natl. Acad. Sci., 58 (1967) 2377-2384.

144 - YOUNG, F.E. et JACKSON, A.P., Biochem. Biophys. Res. Commun. 23 (1966) 490-495.

145 - YOUNG, F.E. et SPIZIZEN, J., J. Biol. Chem. 238 (1963) 3126-3130.

146 - YOUNG, F.E., TIPPER, D.J. et STROMINGER, J.L., J. Biol. Chem. 239 (1964) PC 3600-3602.

147 - YPHANTIS, D.A., Biochemistry, 3 (1964) 297-317.

148 - YAMADA M., HIROSE A. et MATSUHASHI M. J. Bacteriol. 123 (1975) 678-686.

TABLE DES MATIERES

pages

INTRODUCTION

L'enveloppe de la cellule bactérienne 5
Anatomie de la paroi bactérienne 6
Protéines des parois bactérienne 8
- bactéries gram-positives 9
- bactéries gram-négatives 11

CHAPITRE I

Techniques

A - Produits et enzymes commerciaux utilisés 13

- Techniques analytiques 14

- Analyse quantitative en acides aminés et hexosamines 14
- Dosage des protéines 14
- Dosage du phosphore 14
- Dosage du glucose 14
- Dosage du magnésium 15
- Dosage des lipides 15
- Dosage des sucres 15
- Dosage du glycérol 16
- Dosage des groupements sulfhydriles 16
- Détermination des groupements amides des peptides 16
- Dosage des groupements N-terminaux 16
- Détermination de la stéréoisomérie des acides aminés 18
- Dosage du glucosaminitol et du muramicitol 19
- Electrofocalisation 19
- Poids moléculaire par vitesse de sédimentation 20
- Electrophorèses sur gel de polyacrylamide 20
- Comptage de radioactivité 21
- Système de solvants de chromatographie 21

B - Techniques bactériologiques

- Cultures de B. subtilis 168 wt et B. subtilis cbl-1 21
- Comptage des bactéries 21
- Préparation des parois 22

C - Techniques biochimiques

- Autolyse des parois 22
- Isolement du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 22

- Inactivation par la chaleur 23
- Préparation des protoplastes et des membranes 23
- Essai enzymatiques pour la CDP-glycérol polyglycérol phosphate transférase 24
- Techniques immunochimiques 24

CHAPITRE II

Morphologie et caractérisation chimique de la paroi de B. subtilis cbl-1.

A - Microscopie électronique du mutant et de la souche parentale

A - Bactéries entières 26
B - Parois 29

B - Composition chimique des parois de B. subtilis 168 wt et de B. subtilis cbl-1 29

C - Corrélation des résultats de microscopie électronique et des données analytiques. 42

CHAPITRE III

Etude de la partie protéique de la paroi de B. subtilis cbl-1

A - Isolement de la partie protéique après autolyse des parois 48

B - Poids moléculaire 50

C - Dosage des groupements sulfhydriles 50

D - Solubilisation de la paroi par des agents chimiques 56

E - Isolement de la partie protéique après action du chlorure de lithium 6 M sur la paroi de B. subtilis cbl-1 60

F - Analyse de la partie protéique par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 63

a) Partie protéique isolée par autolyse 63
b) Partie protéique isolée par le chlorure de lithium 6 M 72
c) Partie protéique solubilisée par l'urée 72
d) Comparaison de la partie protéique isolée par différents traitements avec la paroi entière 72

G - Electrofocalisation 78

H - Immunochimie 79

I - Bilan des macromolécules de la paroi de B. subtilis cbl-1 82

J - Mode d'association de la protéine cbl-1 avec la paroi 85

K - Existence de la protéine cbl-1 au cours de la croissance bactérienne 85

CHAPITRE IV

Etude des macromolécules non protéiques de la paroi de B. subtilis cbl-1.

A - Les acides téïchoïques 89

B - Le peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 90

a - Méthodes d'obtention du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 91

1) action du dodécylsulfate de sodium à 2% sur la paroi 91
2) action du chlorure de lithium 6M sur la paroi 94
3) action du dodécylsulfate de sodium à 2% sur les bactéries entières 94
4) action enzymatique sur la paroi 96

b - Caractérisation du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 96

c - Détermination de la structure du peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 96

1) Analyse des produits d'autolyse 96
2) Action du lysozyme sur le peptidoglycane de B. subtilis cbl-1 100
3) Action du lysozyme sur le peptidoglycane inactivé de B. subtilis cbl-1 110
4) Degré de pontage des chaînes peptidiques 114

C - Les polysaccharides de la paroi de B. subtilis cbl-1 117

CHAPITRE V

Le système autolytique de B. subtilis cbl-1

A - Rappel des données sur le système autolytique de B. subtilis 119

B - Le système autolytique de B. subtilis cbl-1 120

a) Mise en évidence d'une activité N-acétylmuramyl-L-alanine amidase 120
b) activité glycosidasique 125
c) quelques propriété du système autolytique étudié 126

DISCUSSION 131

BIBLIOGRAPHIE 142

TABLE DES MATIERES 150